

UNIVERSITÉ DE MONS

FACULTÉ DES SCIENCES

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille
solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera,
Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae)

Promoteur : Dr. Denis Michez

Co-promotrice : Dr. Maryse Vanderplanck

Mémoire de fin d'études présenté par
Audrey DUHIN

En vue de l'obtention du grade de
Maître en Sciences Biologiques

Année académique : 2015 – 2016

Duhin, A., 2016., Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) Mémoire en Sciences Biologiques, Université de Mons, 73 p.

Résumé :

Les interactions biologiques sont à la fois très complexes et fascinantes. Dans ce travail, il est question de l'interaction de pollinisation. Celle-ci implique une plante et un vecteur, qui est, dans le cas étudié ici, un insecte et plus précisément une abeille. Les traits floraux impliqués dans la reconnaissance de l'hôte par le pollinisateur sont variés et peuvent être des traits visuels, olfactifs et/ou chimiques. Leur importance relative et leur évolution sont cependant encore mal compris. Nous nous sommes penchés sur deux modèles : d'une part, les saules (genre *Salix* L.) et d'autre part, *Andrena vaga* qui est une abeille solitaire oligolectique (i. e. spécialiste) de ce genre végétal, mais qui visitent seulement certaines espèces et pas d'autres. L'objectif est de déterminer ce qui conduit l'abeille à faire ces choix spécifiques parmi des espèces présentant visiblement la même morphologie florale et pour cela, la qualité chimique du pollen en acides aminés, stérols et polypeptides ainsi que les parfums floraux ont été investigués. Par ailleurs, une phylogénie du genre *Salix* L. a été réalisée afin de déterminer si certains caractères (i. e. traits chimiques du pollen, visite d'*A. vaga*) peuvent être liés à l'histoire évolutive des saules. Enfin, des tests éthologiques ont été réalisés avec des espèces présentant des caractéristiques chimiques différentes au niveau du contenu nutritionnel du pollen. Nos résultats montrent que le contenu en polypeptides du pollen semble être lié à la visite de l'abeille solitaire. En effet, les espèces avec une forte concentration sont visitées par *A. vaga* alors que celles qui ont une faible concentration ne le sont pas. Les parfums floraux ne semblent par contre pas annoncer cette qualité chimique. Les tests éthologiques réalisés afin de confirmer cette hypothèse, en présentant tantôt des espèces semblables en contenu polypeptidique et tantôt significativement différentes pour le même critère, n'ont rien démontré de significatif avec les données récoltées. Il semble également que le contenu nutritionnel du pollen ainsi que les parfums ne soient pas corrélés à la phylogénie.

Mots-clés : Oligolectisme, abeille, saules, qualité du pollen, parfums floraux, phylogénie, reconnaissance d'hôtes.

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier le Professeur Pierre Rasmont de m'avoir accueillie dans son Laboratoire de Zoologie à l'UMONS, mais aussi pour m'avoir donné le goût et transmis sa passion pour l'étude des organismes et de l'écologie.

Ensuite, je veux remercier mon promoteur, le docteur Denis Míchez qui m'a beaucoup aidé dans la thématique des interactions entre les plantes et les insectes ainsi que pour l'échantillonnage, mais également pour ses conseils lors de la rédaction.

Comment ne pas remercier ma co-promotrice, le docteur Maryse Vanderplanck, qui m'a énormément aidé pour arriver au bout de ce travail aussi bien scientifiquement que moralement.

Il me semble aussi important de remercier particulièrement certains des membres du laboratoire de Zoologie de l'UMONS qui m'ont tantôt aidée pour des analyses de stérols comme Pierre-Laurent, tantôt pour des quantifications de polypeptides comme Nathalie.

Je tiens à remercier Alex pour m'avoir accompagnée sur le terrain pour collecter mes parfums mais surtout pour être venu avec moi en Autriche pour analyser ces parfums, ce qui a été une superbe semaine.

Je me dois ensuite de remercier une seconde personne pour m'avoir accompagnée à la récolte des parfums : Baptiste, qui m'a également aidée pour l'utilisation du logiciel Mesquite avec les conseils de Nicolas, à qui j'adresse également mes sincères remerciements.

Ensuite, mes remerciements vont à tous les autres membres du laboratoire : Manu, Maxence, Romain, Hélène, Marlyse, Alexandre, Coraline, Sarah, Morgane et Maxime qui m'ont également encouragé et aidé quotidiennement dans ce travail.

Je vais également adresser un merci tout particulier à Dimitri, notre technicien, qui est toujours prêt à trouver ce dont nous avons besoin pour réaliser nos expériences.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Je tiens également à remercier particulièrement Stefan Dötterl et son équipe dont Irmí (Irmgard Shäffler de son vrai nom) qui m'ont tout appris ou presque sur l'étude des parfums floraux.

La suite de ces remerciements s'adresse à Steven Janssens, Wim Baert, Alexia Semeraro et Brecht Verstraet du Jardin Botanique de Meise, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire, ou assisté dans l'échantillonnage, pour la phylogénie des saules.

Il me semble également opportun de remercier deux laboratoires de l'UMONS. D'abord, le Laboratoire de qui m'a fourni de la glace carbonique in extrémis pour conserver mes échantillons avant mon départ pour l'Autriche ainsi que pour m'avoir permis de réaliser mes manipulations de quantification de polypeptides dans leurs locaux. Ensuite, le Laboratoire de biologie marine pour m'avoir permis de lyophiliser mes échantillons de pollen avant leur caractérisation chimique.

J'en viens maintenant aux remerciements plus personnels qui s'adressent à mes compagnons de galère : Marie, François, Florian, Manon, Médéric, Camille, Guillaume et Marta, avec qui nous avons traversé les années d'études avec succès et qui ont toujours été d'un grand soutien moral.

Je tiens à remercier tous mes amis mais tout spécialement ma meilleure amie Laura qui a toujours été là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments.

Enfin, parce qu'ils sont un fondement dans ma vie, je tiens à remercier tous les membres de ma famille et particulièrement mon père, ma belle-mère et ma sœur mais j'ai une pensée particulière pour ma maman qui, si elle était encore en vie, serait sans nul doute très fière de moi.

Table des matières

1	Introduction.....	6
1.1	Interactions plantes-insectes : du mutualisme à l'antagonisme.....	6
1.1.1	Généralités.....	6
1.1.2	La pollinisation.....	7
1.2	Les abeilles : pollinisatrices herbivores.....	9
1.2.1	Histoire naturelle.....	9
1.2.2	Alimentation et besoins physiologiques.....	10
1.2.3	Reconnaissance des plantes hôtes.....	11
2	Objectifs.....	13
3	Modèles.....	14
3.1	<i>Andrena vaga</i>	14
3.2	Le genre <i>Salix</i> L.....	16
4	Matériel et méthode.....	17
4.1	Spécimens de saules étudiés.....	17
4.2	Population d' <i>Andrena vaga</i> étudiée.....	18
4.3	Chimie du pollen.....	19
4.3.1	Échantillonnage.....	19
4.3.2	Analyses.....	19
4.3.3	Statistiques.....	20
4.4	Parfums floraux.....	21
4.4.1	Échantillonnage.....	21
4.4.2	Analyse qualitative et quantitative.....	22
4.5	Tests éthologiques.....	23
4.5.1	Échantillonnage.....	23
4.5.2	Protocol expérimental.....	23
4.5.3	Statistiques.....	25

4.6	Phylogénie des saules	25
4.6.1	Échantillonnage	25
4.6.2	Analyse	26
5	Résultats	28
5.1	Chimie du pollen	28
5.1.1	Acides aminés	28
5.1.2	Stérols	35
5.1.3	Polypeptides	38
5.2	Parfums floraux	40
5.3	Tests éthologiques	42
5.3.1	Première année : Tests sur des espèces similaires du point de vue de la concentration en polypeptides	42
5.3.2	Deuxième année : Tests sur des espèces différent du point de vue de la concentration en polypeptides	43
5.4	Phylogénie	45
5.4.1	Phylogénie du genre <i>Salix</i>	45
5.4.2	Phylogénie des espèces de saule étudiées	46
5.4.3	Character mapping	47
6	Discussion	49
6.1	Variabilité des traits floraux et phylogénie	49
6.2	Syndrome de pollinisation et traits chimiques du pollen et volatils	50
6.3	Tests éthologiques et ressource alimentaire	52
7	Conclusion	53
8	Perspectives	54
9	Références	55
10	Annexes	65

1 Introduction

1.1 Interactions plantes-insectes : du mutualisme à l'antagonisme

1.1.1 Généralités

Les interactions biologiques sont à la base de la diversification et de la complexification du monde vivant. Il est donc essentiel de les comprendre pour caractériser la biodiversité et également pour pouvoir la conserver, ce qui est un des défis de notre époque.

Il existe plusieurs types d'interactions caractérisées et définies selon leurs effets sur les organismes impliqués. Ces effets interactionnels varient entre les parties et peuvent avoir des conséquences les organismes de manière positive, négative ou neutre donnant lieu à diverses combinaisons (Tableau 1). Ces interactions forment un continuum s'étalant du mutualisme, où les effets sont positifs pour les deux êtres vivants impliqués à l'antagonisme, où les effets sont négatifs pour les deux parties (Aladjov 2011).

Tableau 1 : Interactions biologiques : définitions et effets sur les parties où 0 : effet neutre, + : effet positif et - : effet négatif (d'après Aladjov 2011).

Type d'interaction	Définition	Effet sur X	Effet sur Y
Neutralisme	Le neutralisme décrit la relation entre deux objets qui interagissent mais dont l'interaction n'a aucun effet.	0	0
Amensalisme	L'amensalisme entre deux objets x et y qui implique que y diminue le succès de x sans que x n'ait d'effet sur y.	-	0
Commensalisme	Le commensalisme entre deux objets x et y arrive quand x bénéficie de y tandis que x n'a aucun effet sur y.	+	0
Antagonisme	L'antagonisme est une interaction qui s'établit au détriment des deux organismes impliqués.	-	-
Mutualisme	Le mutualisme est une interaction bénéfique pour les deux parties.	+	+
Prédation	La prédation ou le parasitisme entre deux organismes x et y caractérise une interaction au sein de laquelle x tire des bénéfices aux dépens de y.	+	-
Parasitisme			

Parmi ces interactions, l'herbivorie est un cas particulier de prédation/parasitisme où un animal se nourrit d'un végétal. Un autre mode d'interaction remarquable est la symbiose qui est un cas particulier de mutualisme devenu obligatoire pour chacune des parties.

Cette catégorisation théorique est cependant parfois déjouée par la nature et certains organismes peuvent jouer les agents doubles. Parmi eux, les abeilles (i.e. larves et imagos) se nourrissent exclusivement de nectar et de pollen, ce qui en fait des animaux strictement herbivores (Michener 2007). Par le biais de la collecte de ces ressources, les abeilles participent toutefois activement à la pollinisation des plantes à fleurs, partageant conjointement le statut de pollinisateurs (effet positif sur le succès reproducteur de la plante) et d'herbivores (effet négatif sur le succès reproducteur de la plante). La relation plante-abeille ne peut dès lors pas être considérée comme un mutualisme simple mais est actuellement qualifiée d'« exploitation mutuelle » où les coûts et bénéfices doivent être relativement équilibrés pour les deux parties (Westerkamp 1997).

Toutefois, cet équilibre coût/bénéfice peut être compromis dans certains cas, soit pour l'abeille soit pour la plante. En effet, les plantes peuvent mettre en place des stratégies de tromperie, par exemple certaines espèces d'orchidées qui émettent des signaux chimiques et/ou visuels semblables à ceux du partenaire sexuel du pollinisateur qui n'adopte donc pas de comportement de collecte lors de la visite (i.e. tromperie sexuelle ; Vereecken et al. 2012). À l'inverse, les abeilles peuvent prélever énormément de pollen ou de nectar sans polliniser la plante de par des comportements de collecte particuliers. Ainsi, certains bourdons (i.e. genre *Bombus*) percent la corolle des plantes et prélèvent du nectar sans entrer en contact avec les étamines ou le stigmate, empêchant le processus de pollinisation alors que la production florale est consommée (Irwin et al. 2010).

1.1.2 La pollinisation

1.1.2.1 Généralités

Pour qu'il y ait reproduction sexuée chez les plantes à fleurs, il doit y avoir rencontre des gamètes mâles (contenus dans les grains de pollen) et des gamètes femelles (contenus dans les ovules). Les plantes étant immobiles, cette rencontre s'effectue par le transfert de pollen (i. e. pollinisation) via des vecteurs abiotiques tels que le vent (anémophilie), l'eau (hydrophilie) pour les plantes aquatiques, ou biotiques, via les animaux (zoophilie). La pollinisation s'effectue le plus souvent de manière croisée pour favoriser la diversité

génétique. Cela signifie que les gamètes ne sont féconds que s'ils proviennent d'un autre individu (Stebbins 1970).

1.1.2.2 *Syndrome de pollinisation*

Le syndrome de pollinisation est l'ensemble des traits floraux (i. e. visuels, olfactifs, etc.) qui sont propres à un vecteur de pollinisation et qui résultent d'une convergence évolutive due à la pression exercée par ce vecteur (Faegri and van der Pijl, 1979 ; Johnson and Steiner, 2000). Parmi les vecteurs biotiques (i.e. êtres vivants), divers phylums sont représentés. Ainsi, les insectes (entomophilie), oiseaux (e.g. colibri) ou encore certains mammifères tels que les rongeurs (i.e. pollinisation de certaines Proteaceae) ou les chauves-souris (i.e. pollinisation du genre *Burmeistera*) peuvent être responsables de la pollinisation de certaines espèces de plantes à fleur (Fenster et al. 2004, Ollerton et al. 2009).

Parmi les modes de pollinisations, l'anémophilie et l'entomophilie sont les plus courants. Lorsque le pollen est transporté par le vent, les fleurs présentent généralement les caractéristiques suivantes : (i) une tendance à être groupées en inflorescences denses, (ii) une petite taille, (iii) un périanthe réduit voir même absent, (iv) l'absence de production de nectar, (v) des anthères qui présentent un abondant pollen et qui s'ouvrent brusquement, (vi) un large stigma et (vii) une séparation des sexes, soit par des inflorescences séparées sur un même pied (plante monoïque), soit par des pieds mâles et femelles séparés (plante dioïque). Dans le cas de l'entomophilie, les fleurs ont tendance à présenter les caractéristiques inverses. Le passage d'un mode de pollinisation à l'autre engendre de ce fait des modifications morphologiques de la fleur (Stebbins 1970).

Parmi les insectes, les ordres les plus connus en tant que pollinisateurs sont les Hyménoptères et les Lépidoptères bien que certains Diptères et Coléoptères puissent également participer à la pollinisation. Afin d'attirer ces pollinisateurs, plusieurs facteurs entrent en compte tels que la couleur visible ou dans l'ultra-violet, la forme (Kevan 1972), la présence de nectar ou encore l'odeur de la fleur (Wäckers 2004). Parmi les traits floraux, le parfum doit tout spécialement fournir des signaux spécifiques qui guident les abeilles et contribuent à la sélection hôte-pollen (Füssel et al. 2007, Burger et al 2010a, 2010b, Milet-Pinheiro et al. 2012, Dötterl and Vereecken 2010).

En plus d'être perceptible avec les traits visuels et olfactifs, le mode de pollinisation se reflète également dans la qualité chimique du pollen produit (Lidforss 1899). Ainsi, il est

communément admis que les plantes anémophiles produisent de large quantité de pollen de plus faible qualité alors que la production des plantes zoophiles est plus restreinte mais de meilleure qualité, faisant office de récompense nutritive pour les pollinisateurs (Roulston et al. 2000, Hanley et al. 2008). Cependant, aucune différence significative entre les deux modes de pollinisation n'a été détectée en termes de taux en protéines (Roulston et al. 2000).

La structure du grain de pollen a également une certaine importance pour la pollinisation. Ainsi, le manteau pollinique ou pollenkitt dont la composition est essentiellement constituée de lipides neutres, d'hydrocarbures, de terpènes, et de pigments caroténoïdes (Dobson 1988; Nepi et Franchi 2000; Hesse 2000), recouvre les grains de pollen de presque tous les angiospermes à pollinisation zoophile car ce manteau permettrait aux grains de pollen de s'agglutiner sur le pollinisateur. Par contre, il peut être réduit voir nul chez les espèces anémophiles (Hesse 1979a; b; c).

1.1.2.3 La qualité nutritionnelle comme filtre chimique

Malgré leur besoin commun d'attirer les pollinisateurs, il s'avère que les espèces entomophiles arborent une variation considérable de la qualité de leur pollen. En effet, diverses analyses ont révélé que le pollen des plantes à fleurs présente une variabilité en terme d'abondance et de composition en métabolites secondaires toxiques (e.g. alcaloïdes; Gosselin et al. 2013, Kempf et al. 2010), en éléments nutritifs essentiels (e.g. acides aminés essentiels ; Weiner et al. 2010) ainsi qu'en terme de digestibilité (e.g. résistance de la paroi du pollen ; Roulston and Cane 2000). De par ces variations, le pollen ne constitue donc pas une ressource universellement exploitable mais les abeilles nécessitent des adaptations physiologiques spécifiques aux plantes hôtes exploitées (Praz et al. 2008). De ce fait, la qualité nutritive peut constituer une contrainte physiologique régissant en partie les interactions plante-abeille. De manière générale, la composition chimique du pollen pourrait ainsi agir comme un « filtre », réduisant la gamme de visiteurs et assurant l'attraction spécifique d'un groupe fonctionnel de pollinisateurs.

1.2 Les abeilles : pollinisatrices herbivores

1.2.1 Histoire naturelle

L'appellation « abeille » désigne les espèces (environ 20 000 décrites) appartenant au groupe monophylétique des apoïdes apiformes et qui sont herbivores (i.e. se nourrissent de pollen et de nectar). On distingue ce groupe de celui des apoïdes sphéciformes qui contient

des guêpes solitaires carnivores. La superfamille des Apoidea appartient au sous-ordre des Aculeates, appartenant lui-même à l'ordre des Hymenoptera (Michener 2007, Brothers & Carpenter 1993).

La super-famille des Apoidea est divisée en neuf familles, classées en deux groupes selon la longueur de la langue : les langues courtes (familles des Colletidae, des Stenotritidae, des Halictidae, des Andrenidae, des Melittidae *sensu stricto* (s.s.), des Meganomiidae et des Dasypodidae) et les langues longues (deux familles : Megachilidae et Apidae) (Danforth et al. 2006).

Selon Michener (2007), plus de la moitié des espèces d'abeilles sont solitaires. Contrairement aux espèces sociales bien connues du grand public, les espèces solitaires ne vivent pas en groupes organisés et aucune répartition de tâches entre castes n'est établie (i.e. pas de distinction entre reine et ouvrières). Bien que pour certaines espèces des aggrégations de nid soient observées, chaque femelle établit ses propres nids qu'elle approvisionne avant de pondre ses œufs et de mourir. L'émergence de la progéniture se produit l'année d'après, il n'y a donc aucun contact intergénérationnel. Par ailleurs, il semblerait que les abeilles solitaires aient une plus grande capacité à reconnaître et mémoriser des sources alimentaires (Dukas and Real 1991).

1.2.2 Alimentation et besoins physiologiques

Les abeilles ont besoin d'une source énergétique qu'elles trouvent dans nectar sous forme d'hydrates de carbone. Elles se nourrissent également de pollen car elles y trouvent de quoi satisfaire d'autres besoins que sont ceux en protéines, en acides aminés pour leur métabolisme protéique ainsi qu'en stérols comme le cholestérol (27 atomes de carbone) pour pouvoir synthétiser l'hormone de mue, également appelée ecdysone (Brodscheider and Crailsheim 2010). Cependant, peu de plantes produisent du cholestérol mais produisent en revanche d'autres phytostérols (28 ou 29 atomes de carbone) (Hopkins 2003, Akihisa et al. 1991) et les abeilles ont des voies métaboliques adaptées pour les exploiter.

Il est possible de classer les abeilles selon leur niveau de spécialisation alimentaire : certaines sont spécialistes sur une seule famille de plante et on les appelle alors oligolectiques. En revanche, d'autres espèces sont généralistes et on les nomme alors polylectiques, ce qui implique qu'elles se nourrissent sur des plantes appartenant à un rang taxonomique plus élevé que la famille (Robertson 1925, Cane and Sipes 2006, Müller and Kuhlmann 2008).

La proportion d'espèces oligolectiques parmi les abeilles est de l'ordre de 20 à 30 % (Westrich 1989, Minckley and Roulston 2006). Là où le polylectisme est considéré comme un avantage par le fait que cela réduit la dépendance à un nombre limité de ressources, l'oligolectisme soulève des questions concernant l'écologie, l'évolution et la physiologie (Wcislo and Cane 1996).

L'explication traditionnellement avancée concernant cette spécialisation est la suivante : la spécialisation florale des abeilles est guidée par la limitation de la compétition interspécifique (Robertson 1899, 1925, Michener 1954, Linsley 1958, Thorp 1969, Michener 1979). Cette théorie est faiblement supportée par des considérations faunistiques et biogéographiques qui révèlent que la proportion d'abeilles oligolectiques est plus élevée (jusqu'à 60%) dans les écosystèmes arides (i.e. grande diversité faunistique des abeilles mais ressources florales limitées) que dans les écosystèmes tempérés ou tropicaux (i.e. moins d'espèces d'abeilles mais une plus grande offre et diversité florale) (Michener 1979, Moldenke 1979).

Des explications alternatives ont été formulées par Müller (1996) et Minckley and Roulston (2006), à savoir les contraintes physiologiques ou comportementales et l'efficacité de récolte, respectivement. Cependant, ces deux hypothèses sont basées sur des considérations théoriques et manquent de fondement expérimental.

La variation dans la chimie du pollen peut potentiellement affecter la qualité nutritionnelle du pollen pour les abeilles (Praz et al. 2008, Sedivy et al. 2011), qui peuvent dès lors développer des adaptations et une spécialisation (Janz and Nylin 2008). Ces caractéristiques de l'hôte induisent une efficacité physiologique, une optimisation de la récolte mais aussi une discrimination efficace opérée par le pollinisateur et basée sur les traits chimiques et visuels (Janz and Nylin 2008, Kallenbach et al. 2012).

1.2.3 Reconnaissance des plantes hôtes

L'olfaction est certainement le sens le plus important pour les abeilles et la reconnaissance de leurs plantes hôtes. En effet, ce sont les parfums floraux qui sont les signaux perçus de plus loin par les abeilles mais aussi en premier lieu par les abeilles naïves

(i.e. qui n'ont encore jamais consommé de production florale). Sur base d'analyse électroantennographiques, il semblerait que les abeilles spécialistes aient des récepteurs olfactifs spécifiques aux molécules émises par leurs plantes hôtes (Dötterl and Vereecken 2010). A l'inverse des signaux olfactifs, l'attraction visuelle est limitée à une courte distance (i.e. quelques centimètres à quelques mètres tout au plus) pour les fleurs simples. Cependant, dans le cas de grandes inflorescences ou de grandes densités florales, les traits visuels de la plante peuvent avoir un plus grand rôle notamment via la perception des contrastes de couleurs fleurs/parties végétatives impliquant les récepteurs visuels verts et non pas ceux d'autres couleurs qui sont utiles uniquement de près (Dötterl and Vereecken 2010).

D'après Dötterl and Vereecken (2010), seuls sept taxons d'abeilles spécialistes ont été investigués sur cet aspect de la reconnaissance des plantes hôtes et il reste donc beaucoup de zones de flou autour des parfums floraux et des molécules réellement impliquées dans l'attraction des abeilles. Plus particulièrement, les données concernant les capacités de détection de la composition chimique du pollen par les pollinisateurs sont encore très rares dans la littérature.

2 Objectifs

Bien qu'il soit attendu que les abeilles spécialistes soient intimement adaptées à la leur taxon de plante hôte, que ce soit en terme de reconnaissance (i.e. contraintes neurologiques liées aux traits visuels et olfactifs) ou de physiologie (i.e. contraintes physiologiques liées aux caractéristiques chimiques et/ou structurales du pollen), la présence de filtres floraux dans ces interactions spécifiques pourrait réduire l'éventail des hôtes exploitables, notamment au sein d'un même genre floral. L'hypothèse que de tels filtres puissent façonner les interactions plante-insecte chez les abeilles spécialistes n'a cependant encore jamais été testée à l'heure actuelle.

Pour mieux comprendre la spécialisation des interactions plantes-pollinisateurs, nous avons étudié comment une abeille oligolectique (*Andrena vaga*) fait face à la variabilité de ces hôtes potentiels (du genre *Salix*, Salicaceae) et en sélectionne seulement certains. Il faut alors considérer comment ces hôtes potentiels varient en terme de signaux chimiques (e.g. parfum) et en terme de nutriment, puisés dans le pollen, comme les acides aminés, polypeptides et stérols.

Nous avons exploré les trois points suivants ; 1) les saules montrent-ils une variation interspécifique significative en terme de composition chimique du pollen et cette variation est-elle monophylétique ? ; 2) est-ce que les saules annoncent la qualité nutritionnelle de leur pollen grâce aux molécules volatiles émises par leurs inflorescences ? ; et 3) *Andrena vaga* répond-elle de manière comportementale en fonction des hôtes qui sont disponibles ?

3 Modèles

3.1 *Andrena vaga*

L'espèce *Andrena vaga* a été décrite pour la première fois en 1799 par le naturaliste allemand Panzer. Il s'agit d'une espèce d'abeille solitaire univoltine, psammophile et oligalectique sur le genre *Salix* (Bischoff et al., 2003; Vanderplanck et al., 2009).

Tableau 2 : classification d'*Andrena vaga* dans le règne animal (d'après Rasmont et al. 2009).

Rang taxonomique	Classification
Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Classe	Insecta
Super-ordre	Endopterygota
Ordre	Hymenoptera
Sous-ordre	Apocrita
Super-Famille	Apoideae
Famille	Andrenidae
Sous-famille	Andreninae
Genre	<i>Andrena</i>
Espèce	<i>Andrena vaga</i>

D'un point de vue morphologique, elle est de couleur noire avec un abdomen brillant et des poils gris clairs sur la tête et le thorax (Bellmann, 1999). Le mâle se distingue de la femelle par une plus petite taille et la présence de poils nombreux sur la face.



Figure 1 : Femelle d'*Andrena vaga* à gauche : vue latérale ; à droite : vue dorsale (Grande bruyère de Blaton, crédits : A. Duhin)

La distribution de cette espèce est de type ouest-paléarctique (voir Fig. 2), ce qui signifie que l'on peut la retrouver dans une grande partie de l'Europe (Bischoff et al., 2003).

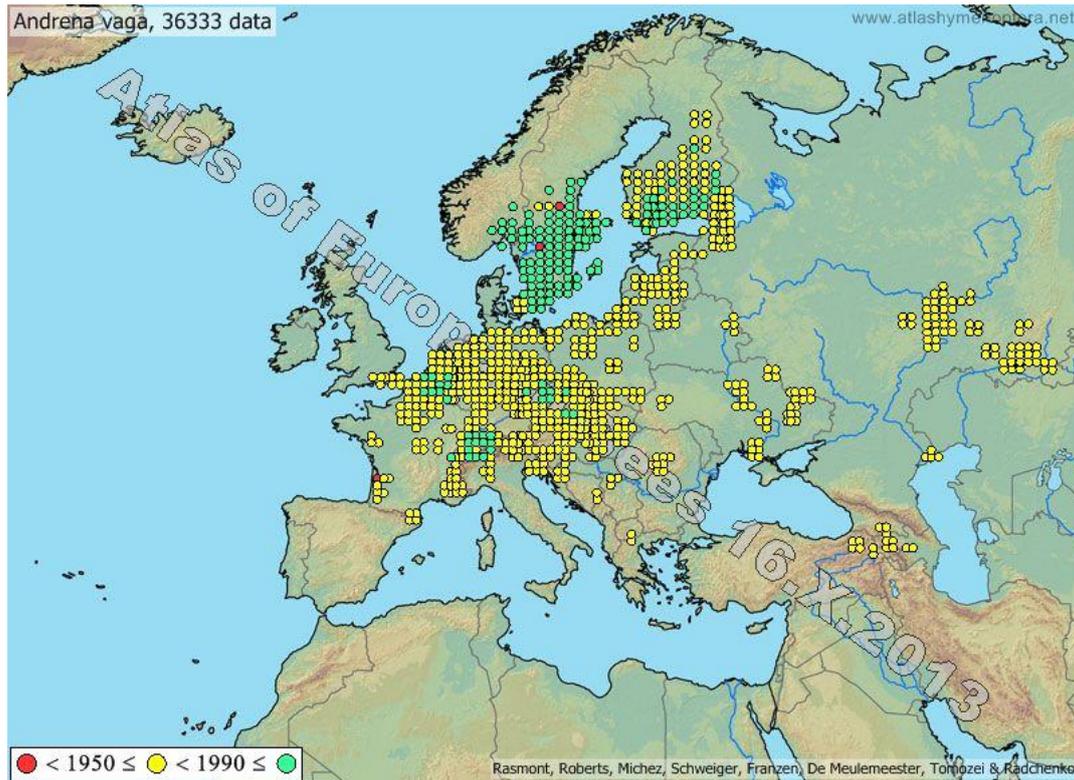


Figure 2 : Distribution d'*Andrena vaga* (d'après le site internet atlashymenoptera.net)

Les mâles émergent avant les femelles. Cet événement est en concordance avec la floraison de leurs plantes hôtes : les saules (genre *Salix* L.), durant les mois de mars à mai (Vanderplanck et al., 2009, Vereecken et al., 2006).

Il s'agit d'une espèce solitaire mais que l'on retrouve fréquemment en large agrégation en raison de ses besoins écologiques qui restreignent les biotopes propices à sa nidification : des zones sablonneuses à proximité de saules (Fig. 3).



Figure 3 : A gauche : nids dans le sable ; à droite : femelle d'*A. vaga* creusant un nid (Grande bruyère de Blaton) (crédits : A. Duhin).

3.2 Le genre *Salix* L.

Ce genre de la famille des Salicaceae a été décrit par Linné en 1735. Cette famille végétale comprend un autre genre : *Populus* L. et est composée d’arbres dioïques (i.e. arbres avec des individus mâles et des individus femelles séparés pour une même espèce). L’inflorescence est un chaton (i.e. type d’inflorescence en épis contenant des fleurs unisexuées) (Kay 1985, Karrenberg et al. 2002).

Tableau 3 : Classification du genre *Salix* L. dans le règne végétal (d’après Lambinon et al.).

Rang taxonomique	Classification
	Cronquiste (1981) APG III (2009)
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Salicales Malpighiales
Famille	Salicaceae
Genre	<i>Salix</i>

Le genre *Salix* L. a une distribution assez large dans tout l’hémisphère Nord, dans les zones tempérées et souvent humides (Zhen-Fu 1987, Argus 2007).

La pollinisation du genre *Salix* L. s’opère par divers facteurs que sont le vent (i.e. anémophilie) et les insectes (i.e. entomophilie). Les différentes espèces de saules présentent divers taux de pollinisation par ces deux vecteurs mais la plupart seraient entomophiles. De plus, il s’agit d’un genre attirant particulièrement les espèces d’abeilles solitaires. Cependant, d’autres insectes mais aussi des oiseaux peuvent polliniser les saules (Füssel et al. 2007, Kay 1985).

4 Matériel et méthode

4.1 Spécimens de saules étudiés

Au total, dix-huit espèces de saule ont été étudiées. Beaucoup de spécimens proviennent du Jardin Botanique de Meise (qui dispose d'une importante collection de saules), d'autres ont été échantillonnés dans leurs milieux naturels (Tableau 4).

Tableau 4 : Espèces de saule étudiées, nombre de répliques pour chaque analyse chimique du pollen avec entre parenthèses les analyses effectuées dans le cadre de ce travail, échantillonnage des parfums floraux avec entre parenthèses les analyses effectuées dans le cadre de ce travail, les autres provenant de Füssel et al. (2007), spécimens échantillonnés pour la phylogénie, localisation des spécimens échantillonnés et information sur la visite d'*Andrena vaga* sur ces espèces, basé sur des observations non-publiées

Espèces de saule	Chimie du Pollen			Parfums	Phylogénie	Localisation	Visité
	AA	Polyp.	Stérols				
<i>Salix alba</i>	3	3	5	2	1	Tertre	Oui
<i>S. apennina</i>	3 (3)	3 (3)	0 (3*)	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. appendiculata</i>	3	3	3	1	1	Meise	Non
<i>S. atrocinerea</i>	6	6	6	2	1	Koolkerke	Non
<i>S. caprea</i>	9	9	9	5	1	Blaton	Oui
<i>S. cinerea</i>	3	3 (2)	2 (1*)	6	1	Meise	Oui
<i>S. dichroa</i>	3	3	3	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. integra</i>	3	3	3	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. irrorata</i>	3	3 (2)	1 (2*)	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. muscina</i>	3	3	3	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. repens</i>	3	2	3	6	0**	Meise	Non
<i>S. sericans</i>	3	3	0 (3*)	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. subopposita</i>	3	3 (2)	2 (1*)	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. triandra</i>	3	0	3	5	1	Koolkerke	Oui
<i>S. udensis</i>	3 (3)	3 (3)	0 (3*)	2 (2)	1	Meise	NA
<i>S. wimmeriana</i>	3	3 (2)	2 (1*)	4 (4)	1	Meise	NA
<i>S. x multinervis</i>	3	3	3	4 (4)	1	Bihain	Non
<i>S. x rubens</i>	9	6	9	4 (4)	1	Nimy, Koolkerke	Oui

*Les données récoltées sur les stérols pour ce travail n'ont pas pu être exploitées en raison de la faible qualité des chromatogrammes obtenus et il n'a pas été possible de recommencer les analyses par manque de matériel végétal.

**Une espèce n'a pas été échantillonnée pour la phylogénie car le spécimen précédemment étudié au Jardin Botanique de Meise est mort depuis.

4.2 Population d'*Andrena vaga* étudiée

Une seule population d'andrènes a été étudiée : celle de la Grande Bruyère de Blaton, sur la commune de Bernissart (Hainaut, Belgique). Il s'agit d'une réserve naturelle domaniale (RND) (12.21 ha), comprise dans un site de grand intérêt biologique (SIGB) (31.84 ha). Cette population a été utilisée pour effectuer des tests éthologiques de choix floraux.

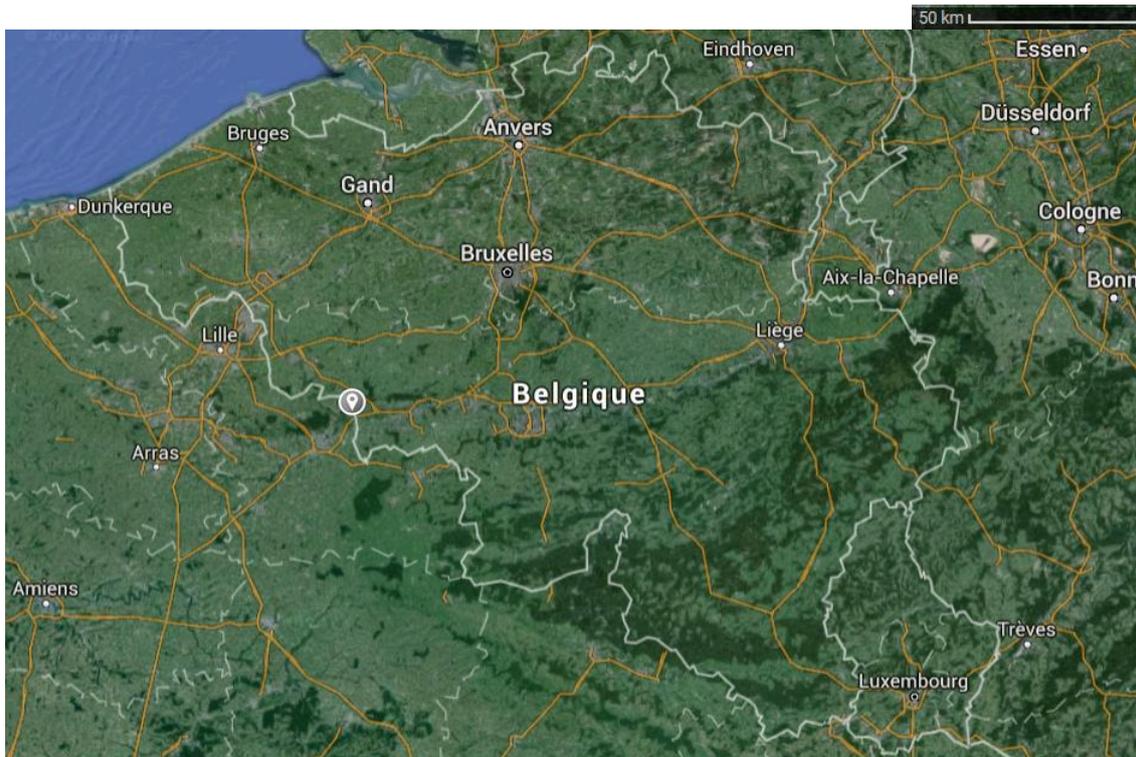


Figure 4 : localisation de la Grande Bruyère de Blaton

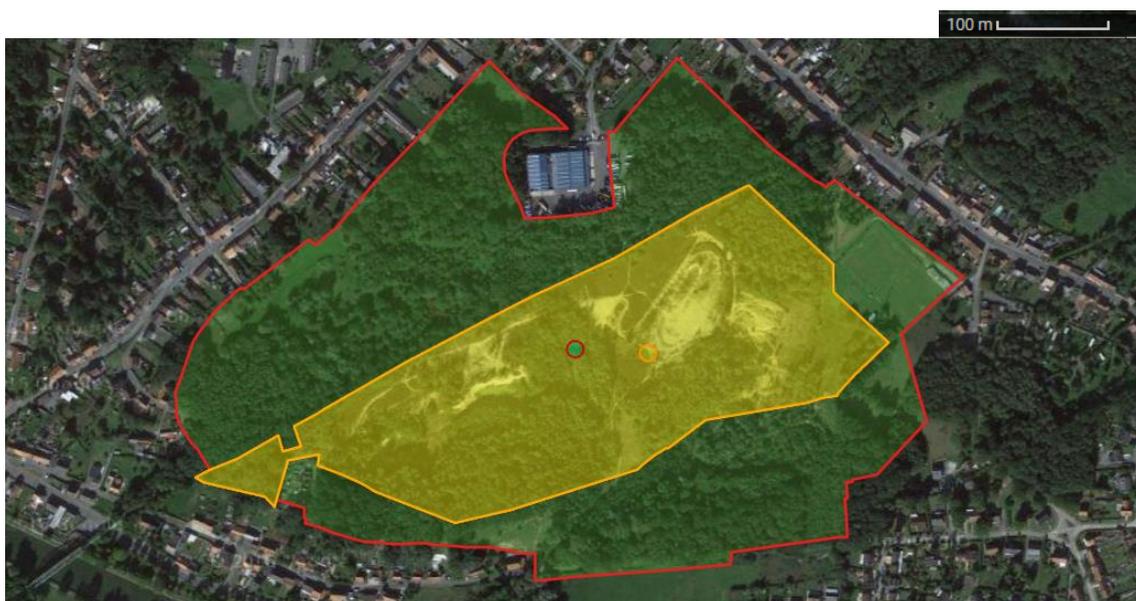


Figure 5 : RND (en jaune) et SIGB (en vert) « Grande Bruyère de Blaton »

4.3 Chimie du pollen

4.3.1 Échantillonnage

Le pollen est prélevé à même l'arbre si l'arbre est au bon stade de floraison. Si les chatons ne libèrent pas le pollen, quelques branches sont prélevées et conservées dans un seau d'eau au laboratoire afin que les anthères mûrissent et libèrent les grains de pollen. Ces derniers sont récoltés sur une plaque en verre au-dessus de laquelle on secoue les chatons. Le pollen est ensuite conservé au congélateur (-20 °C) afin de préserver au mieux tous les composants.

4.3.2 Analyses

4.3.2.1 Acides aminés

Les analyses en composition d'acides aminés du pollen ont été effectuées au centre agronomique Gembloux Agro Bio-Tech (Université de Liège). Des échantillons (entre 2 et 5 mg) de pollen, préalablement lyophilisé et conservé à -20 °C, ont été envoyés en triplicata minimum pour chacune des espèces de saule. L'analyse est effectuée sur 1mL d'une solution d'hydrolyse acide (HCl 6M, phénol 0.1%, norleucine 500 nM/mL) en suivant le protocole de Vanderplanck et al. 2014. La norleucine est un standard interne nécessaire à la quantification. Afin d'éviter la dégradation de la méthionine, les échantillons sont passés une minute à l'azote liquide, avant d'être incubés à 110°C pendant 24h. Ensuite, la solution est évaporée sous vide dans un bain d'eau portée à ébullition (100°C). L'échantillon peut alors être repris dans 1 mL de solution tampon citrate sodium à un pH de 2.2. Cette solution est homogénéisée avant d'être filtrée (0.2 µm). Le filtrat est alors transféré dans un tube HPLC afin d'être injecté. Chaque acide aminé est quantifié séparément dans un chromatographe échangeur d'ion (modèle Biochrom 20plus amino acids analyzer). Une réaction ninhydrine post-colonne est ensuite effectuée pour révéler les dérivés colorés sous une lampe à ultra-violets.

4.3.2.2 Polypeptides

La quantification des polypeptides a été effectuée à l'aide du kit BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific) et ce, après une extraction et une purification suivant la méthode de Vanderplanck et al. (2014). Pour chaque extraction, le pollen (5mg) a été lyophilisé durant 24h puis broyé à l'aide d'azote liquide. Par la suite, trois lavages ont été réalisés, à une température de 4°C. Le premier lavage a été effectué à l'aide de TCA/acétone 10%, le suivant avec du méthanol 80% et de l'acétate d'ammonium 0.1M (mélange à volumes égaux) et enfin

le dernier lavage avec de l'acétone 80%. Une fois le culot séché, les polypeptides ont été extraits à l'aide d'un mélange phénol/SDS. La phase phénolique est ensuite utilisée afin de précipiter les polypeptides, ce qui est réalisé en ajoutant une solution d'acétate d'ammonium méthanolique 0.1M. La solution est gardée à -20°C durant une nuit pour que la précipitation puisse avoir lieu. Le culot ainsi obtenu est lavé successivement à l'aide de méthanol 100% glacé et d'acétone 80% glacé également. Finalement, le culot de polypeptides est brièvement laissé à sécher à l'air libre et enfin dissout dans une solution guanidine.HCl 4M à pH 8.5 pour une quantification BCA, utilisant une courbe de calibration réalisée avec de la BSA (albumine sérique bovine).

4.3.2.3 Stérols

La composition en stérols a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur à ionisation à flamme (GC-FID) après extraction et purification, suivant le protocole de Vanderplack et al. (2011). Les principales étapes sont une saponification réalisée à l'aide de l'hydroxyde de potassium méthanolique, une extraction de partie insaponifiable avec de l'éther diéthylique et quelques lavages de la phase organique, une évaporation du solvant, une chromatographie sur couche mince de silice pour isoler les stérols, une silylation (dérivatisation avec un groupement triméthylsilyle) des stérols et finalement, une séparation des stérols ainsi dérivatisés par chromatographie en phase gazeuse (GC). La quantification est possible par l'ajout d'un standard interne de bétuline. Les identifications de composés ont, quant à elles, été possibles grâce à l'injection de stérols issus d'huile de tournesol, dont la composition est bien connue, et vérifiées par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS). La partie extraction et purification a été réalisée au laboratoire de Zoologie de l'UMONS, tandis que la partie quantification et identification a eu lieu au centre agronomique Gembloux Agro Bio-Tech (Université de Liège).

4.3.3 Statistiques

Afin de traiter les données concernant les différents composés chimiques du pollen étudiés ici, divers tests statistiques ont été effectués. Tout d'abord, pour comparer les concentrations totales entre les différentes espèces, des tests d'analyse de la variance ont été employés, à savoir des ANOVA (Analysis of Variance), ce type de test nécessitant la vérification de l'homocédasticité (test de Bartlett) et de la normalité (test de Shapiro-Wilk), ou des tests de Kruskal-Wallis (qui sont des tests non-paramétriques, utilisés si les conditions d'applications requises n'étaient pas respectées), des comparaisons multiples des moyennes

(tests de Tukey si les conditions d'applications sont respectées) ont été employés. Ensuite, pour comparer les profils en acides aminés et en stérols des différentes espèces, des analyses de variance multivariées avec permutations (PerMANOVA) et également des comparaisons par paire (Pairwise comparaisons) afin de comparer les échantillons entre eux ont été utilisés. Des dendrogrammes ont aussi été réalisés pour illustrer les PerMANOVA, basés sur les distances de Bray-Curtis, qui est un indice de dissimilarité, en utilisant des liens moyens. Pour les acides aminés, il y a également eu une recherche de composés indicateurs avec un test de valeur indicatrice (IndVal pour indicator value). Les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel R 2.14.1 et R 3.3.0.

4.4 Parfums floraux

4.4.1 Échantillonnage

Un total de onze espèces a été échantillonné spécifiquement pour ce travail suivant le protocole mis au point dans Füssel et al. (2007), les sept autres provenant de cette même étude (Tableau 4). Pour chaque espèce, un contrôle et 4 échantillons contenant des fleurs ont été réalisés. Ce contrôle permet d'identifier les composés qui ne sont pas spécifiques aux parfums floraux et qui proviennent des branches, des feuilles ou encore, des éléments du dispositif de capture. Ces composés sont alors retirés de la liste des molécules florales.

Les parfums ont été prélevés entre le 27 mars et le 4 mai 2015, suivant la période de floraison des différentes espèces, durant la matinée ou le début d'après-midi (entre 10h et 14h). Le temps était généralement ensoleillé avec parfois quelques nuages et peu de vent.

Le prélèvement a été effectué à l'aide d'un dispositif spécifique et suivant la même méthode que pour Füssel et al. (2007). Quelques chatons (de 3 à 13, selon leur taille) sont enfermés dans un sac de cuisson en plastique (Nalophan) et deux trous sont alors faits dans ce sac : l'un pour brancher le dispositif de capture des parfums, l'autre, à l'opposé pour permettre un flux d'air au travers des inflorescences. Le dispositif se compose successivement : d'un piège au charbon actif, d'un filtre, d'une pompe ainsi que d'un fluxmètre (réglé sur 0.2 LPM), tous les éléments étant raccordés à l'aide de fin tuyaux en silicone (Fig. 6). La durée du prélèvement a été fixée à 20 minutes.

Le stockage des échantillons a été effectué à -20 °C et ils ont été envoyés à l'Université de Salzbourg pour être analysés (chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (GC-MS)) dans de la carboglace, afin d'éviter la dégradation de l'échantillon.

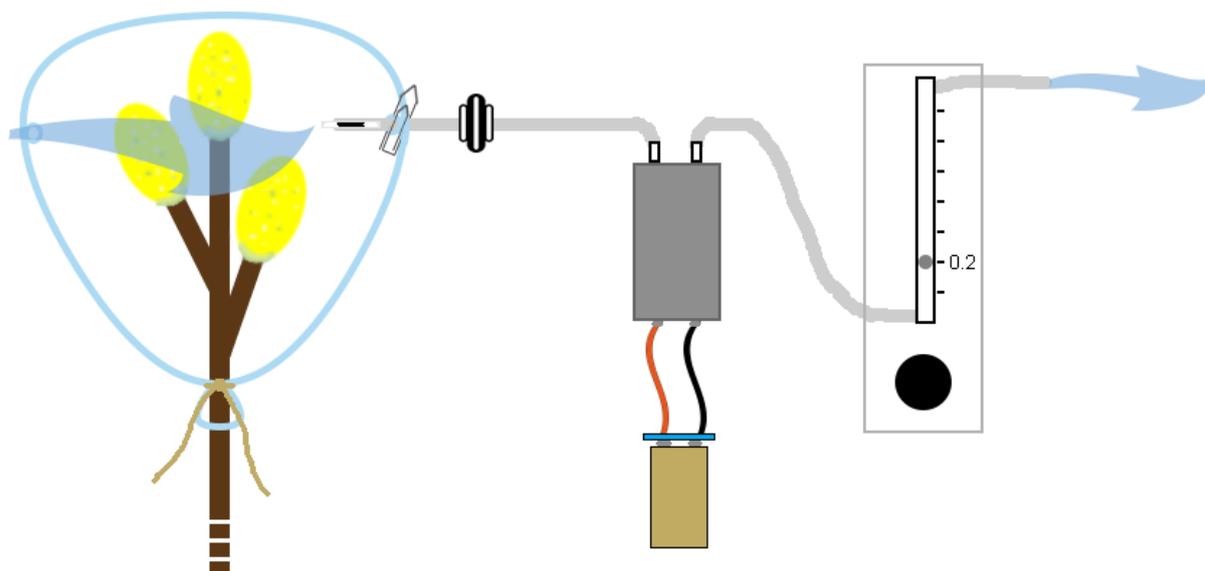


Figure 6 : schéma du dispositif de capture des parfums avec de gauche à droite : les inflorescences jaunes enfermées dans un sac de cuisson auquel est fixé le piège à charbon actif (à l'aide d'un trombone), fiché dans un tube de silicone gris au bout duquel il y a un filtre, relié par un autre tube de silicone à la pompe (alimentée par une pile électrique 9V) et reliée à un fluxmètre réglé sur 0.2 LPM.

4.4.2 Analyse qualitative et quantitative

Cette étude est possible grâce à l'utilisation de la technologie de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. La première partie du dispositif sert à relâcher progressivement les molécules présentes dans l'extrait (en fonction de l'affinité qu'elles ont avec la colonne) tandis que la deuxième partie sert à détecter de quelle molécule il s'agit, grâce à son rapport masse sur charge (m/z) qui est typique à chaque molécule.

L'étude des parfums floraux est longue et difficile. En effet, il faut analyser chaque chromatogramme manuellement afin de répertorier les molécules présentes dans chacun d'eux.

Diverses informations sont ainsi récoltées dans un tableau : le temps de rétention, l'indice de rétention, le nom du composé (trouvé grâce à une base de données implémentée

dans le programme utilisé) ainsi que les six principaux pics de spectrométrie de masse, servant justement à déterminer de quelle molécule il s'agit.

Les analyses chimiques ont été réalisées au GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse) du laboratoire d'Écologie et Évolution de l'Université de Salzburg en Autriche, suivant la méthode décrite dans Füssel et al. (2007).

Par la suite, les spectres ont été analysés à l'aide du programme GCMS Postrun Analysis (GCMSSolution Software), permettant d'identifier les composés présent dans les chromatogrammes obtenus et d'intégrer la surface sous les pics afin d'obtenir les quantités de chaque substance détectée.

4.5 Tests éthologiques

4.5.1 Échantillonnage

Lors de la première année de tests, des branches en fleurs de deux espèces de saules non-significativement ($p > 0,05$) différentes en concentration en polypeptides et dont la période de floraison coïncide avec la période de vol des andrènes ont été étudiées. Ce sont *Salix x rubens* et *S. appendiculata* (récoltés respectivement à Nimy et au Jardin Botanique de Meise le 17 avril pour les 3 premiers jours de test et le 24 avril pour les tests du 27 avril) qui ont été sélectionnées et dont des branches ont été prélevées à l'aide d'un sécateur. Le nombre de chatons a été comptabilisé afin de prélever un minimum de matériel, afin de ne pas endommager notamment les spécimens de jardin botanique ou avoir un effet négatif trop fort sur une population sauvage.

Ces tests préliminaires ont été suivis, l'année suivante, de test avec deux espèces de saules significativement ($p < 0,05$) différentes en terme de contenu en polypeptides et fleurissant durant la période de vol d'*Andrena vaga* : *Salix x rubens* (même arbre que pour la première année de tests) et *S. atrocinerea*. Cette dernière espèce provient de Koolkerke, près de Bruges, et pousse les pieds dans l'eau. La difficile récolte des branches et le petit nombre d'individus mâles de la population n'ont permis de récolter que deux bouquets de 85 inflorescences. Ces branches ont été récoltées le 20 avril 2016.

4.5.2 Protocol expérimental

L'étude comportementale a été réalisée sur la population d'*Andrena vaga* présente à la grande Bruyère de Blaton (sur la commune de Bernissart).

Quatre jours d'expérimentation ont été nécessaires pour réaliser ces tests : les 18, 20, 22 et 27 avril 2015.

Les bouquets de 100 chatons de *Salix x rubens* et de *S. appendiculata* ont été présentés dans des pots contenant de l'eau, fixés à un mètre de hauteur, sur des piquets en bois à l'aide de scotch. Ce dispositif formait un carré de 3m de côté. Deux bouquets de chaque espèce se faisaient face dans les diagonales du carré. Les bouquets étaient changés toutes les heures et à cette occasion, les espèces étaient inversées de position. L'expérimentateur se trouvait au centre du carré et prenait note des paramètres suivants pour chaque visite : le bouquet visité ; le sexe de l'andréne visiteuse et le temps de visite (Fig. 7).

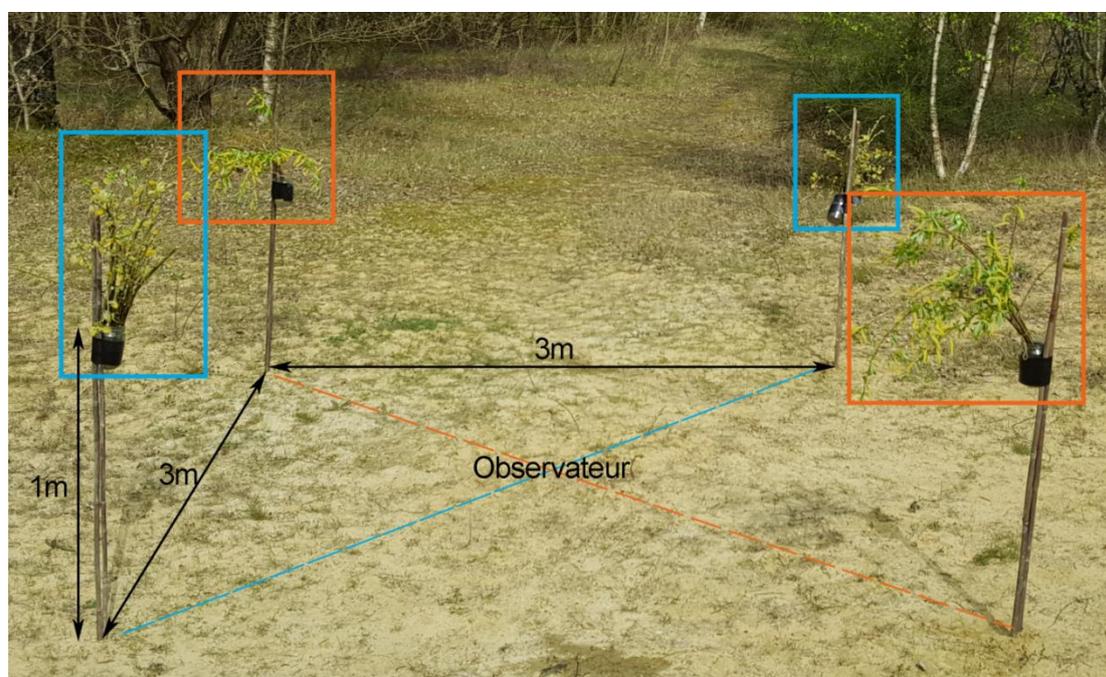


Figure 7 : dispositif expérimental de test éthologique avec une espèce figurée en orange et l'autre en bleu : les 2 bouquets d'une même espèce sont placés à 1 m de hauteur, sur la même diagonale du carré de 3 m de côté, l'observateur se tenant au centre du dispositif

Pour la deuxième année de test, ce sont deux bouquets de *Salix atrocinerea* et deux bouquets de *S. x rubens* qui ont été utilisés dans le dispositif. Une rotation a bien eu lieu toutes les heures mais sans remplacement des bouquets, ceux-ci changeant seulement d'emplacement dans le dispositif. Les tests ont eu lieu les 21 et 22 avril 2016, toujours sur la population d'*Andrena vaga* de la grande Bruyère de Blaton. Le dispositif était identique à celui mis au point l'année précédente (à l'exception du nombre de chatons par bouquet) et les mêmes paramètres ont été mesurés.

4.5.3 Statistiques

Afin de traiter les données récoltées lors des tests éthologiques, des modèles linéaires généralisés mixés (ou GLMM pour Generalized linear mixed model) (Bolker et al. 2009) ont été utilisés afin de tester l'influence des divers paramètres mesurés sur la durée de visite et l'attractivité. Une ANOVA avec approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger a ainsi été réalisée sur le GLMM, après vérification des conditions d'application sur les résidus (Shapiro-Wilk pour la normalité et overdispersion pour l'homoscédasticité). Ces tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel R, versions 2.14.1 et 3.3.0.

4.6 Phylogénie des saules

4.6.1 Échantillonnage

Ce sont toutes les espèces étudiées pour les traits chimiques (chimie du pollen et parfums floraux) qui ont été échantillonnées les 12 et 13 août 2015 à l'exception de *Salix repens rosmarinifolia* dont le spécimen précédemment étudié était mort. Quelques feuilles sont prélevées et placées dans un sachet à thé, lui-même placé dans un sac plastique hermétique dans lequel, des billes de silice sont ajoutée afin d'assécher les feuilles rapidement. Les échantillons peuvent ainsi être conservés plusieurs années.

Parallèlement à la collecte des feuilles, un herbier de référence a été réalisé en collectant, pour chaque arbre échantillonné, un rameau ensuite mis en herbier et conservé au Jardin Botanique de Meise.

Les gènes choisis l'ont été en fonction d'un article récemment paru sur le sujet (Wu et al. 2015) : deux gènes nucléaires ETS et ITS ainsi que deux gènes chloroplastiques : *atpB-rbcl* et *trnD-T*, sur les six gènes employés par Wu et al. (2015). Cependant, les résultats de l'amplification du gène ETS n'étant pas satisfaisant, ils n'ont pas été utilisés.

Des espèces dont les données proviennent de GenBank ont été ajoutées à celles séquencées lors de ce travail pour replacer ces espèces dans un contexte plus global (Fig. 11) avec un total de 64 espèces de saule et 2 out-groups.

4.6.2 Analyse

Les analyses ont été réalisées au Jardin Botanique de Meise avec le docteur Steven Janssens. Toutes les espèces étudiées ont pu être séquencées, à l'exception de *Salix repens rosmarinifolia* dont le spécimen du jardin Botanique de Meise, étudié jusqu'alors, était mort.

Les principales étapes sont tout d'abord, une extraction avec un broyage mécanique, un lavage au sorbitol, une lyse au CTAB (CTAB 2%, PVP-40 1% et mercapto-éthanol 0.3%), l'extraction proprement dite avec du chloroforme et enfin une précipitation à l'isopropanol. La seconde étape est une migration de l'ADN extrait, resuspendu dans du TE (Tris-EDTA), sur gel d'agarose 4% afin de juger la quantité présente en solution. Il est alors possible de diluer l'échantillon. La phase suivante est une amplification par PCR (réaction de polymérase en chaîne) avec les primers présentés dans le Tableau 5. Une migration est à nouveau effectuée afin, cette fois-ci, de vérifier que des fragments ont bien été amplifiés. Les produits ont alors pu être nettoyés des différents éléments ajoutés lors de la PCR et inutiles désormais avant d'être envoyés à une firme extérieur (MacroGen) afin d'être séquencés.

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les 4 gènes amplifiés (toutes écrites de le sens 5' vers 3'), F signifie forward et R signifie reverse

Amorce	Séquence	Référence
ITS4 (F)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
ITS5 (R)	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al. (1990)
ETS-Erit-F	CTTGTATGGGTTGGTTGGA	Negrón-Ortiz and Watson (2002)
18S-ETS (R)	ACTTACACATGCATGGCTTAATCT	Baldwin and Markos (1998)
atpB-1 (F)	ACATCKARTACKGGACCAATAA	Chiang et al. (1998)
rbcL-1 (R)	AACACCAGCTTTTRAATCCAA	Chiang et al. (1998)
trnD-F	ACCAATTGAACTACAATCCC	Fénart et al. (2006)
trnT-R	CTACCACTGAGTTAAAAGGG	Fénart et al. (2006)

Par la suite, les séquences ont été alignées avec le programme Geneious (Kearse, 2012). Le programme Metapiga 3.1 a été utilisé pour réaliser un arbre avec la méthode de maximum de vraisemblance et des valeurs de bootstrap ont également été calculées pour cet arbre.

Diverses séquences provenant de GenBank (publiée par Wu et al. (2015)) ont été utilisées pour avoir une vue plus générale des espèces étudiées ici dans le genre *Salix*. Les numéros d'accès des séquences réalisées pour ce travail seront disponibles une fois qu'un article utilisant ces données sera publié.

Sur base d'un nouvel arbre ne comprenant que les espèces étudiées dans ce mémoire et réalisé de la même manière que le premier (maximum de vraisemblance et bootstrap avec le programme Metapiga 3.1), du character mapping a été réalisé sur l'arbre obtenu en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel Mesquite 3.04.

5 Résultats

5.1 Chimie du pollen

5.1.1 Acides aminés

La composition en acides aminés totaux a été étudiée ainsi que celle en acides aminés essentiels (i.e. arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tyrosine, valine (De Groot, 1953)). Les analyses permettent d'avoir une concentration globale en acides aminés pour chaque espèce mais aussi son profil détaillé et ces deux aspects sont étudiés pour les acides aminés totaux ainsi que pour les essentiels.

5.1.1.1 Acides aminés totaux

5.1.1.1.1 Comparaison des concentrations globales

Une ANOVA univariée a été réalisée pour analyser la variance, tous acides aminés confondus. Avant de pouvoir faire ce test, il faut vérifier deux conditions d'application. En effet, les données doivent suivre une distribution normale et afin de vérifier que c'est bien le cas, un test de Shapiro-Wilk a été effectué. Pour les données brutes (i. e. sans transformation mathématique), ces conditions d'application ne sont pas respectées. Une transformation logarithmique des données a été employée afin de rencontrer les conditions d'application de l'ANOVA (Normalité - Test de Shapiro-Wilk : $W = 0,973$; $p\text{-value} = 0,142$ et Homoscédasticité - Bartlett's K-squared = $27,317$; $df = 17$; $p\text{-value} = 0,054$).

L'ANOVA ainsi réalisée, sur les données modifiées, donne un résultat significatif au seuil de 0,05 avec une F-value de 4,423 ($p < 0,001$). Il y a donc une différence significative ($p < 0,05$) entre au moins deux espèces de saule.

Un test de comparaison multiple des moyennes a été effectué afin de déterminer pour quelles espèces les moyennes différaient entre-elles, ce qui est possible grâce à l'utilisation d'un test de Tukey (Tableau 6). L'espèce *Salix sericans* diffère de beaucoup d'autres espèces.

Tableau 6 : Paires d'espèces de saules dont les moyennes diffèrent significativement ($p < 0,05$), sur base d'un test de Tukey et probabilité associée pour les acides aminés totaux

Paires d'espèces de saule	Probabilité
<i>Salix sericans</i> - <i>S. alba</i>	0.013
<i>S. sericans</i> - <i>S. appendiculata</i>	< 0.001
<i>S. subopposita</i> - <i>S. appendiculata</i>	0.022
<i>S. udensis</i> - <i>S. appendiculata</i>	0.017
<i>S. sericans</i> - <i>S. atrocinerea</i>	0.013
<i>S. sericans</i> - <i>S. caprea</i>	0.002
<i>S. sericans</i> - <i>S. integra</i>	0.001
<i>S. sericans</i> - <i>S. muscina</i>	0.012
<i>S. subopposita</i> - <i>S. repens rosmarinifolia</i>	0.037
<i>S. udensis</i> - <i>S. repens rosmarinifolia</i>	0.030
<i>S. x multinervis</i> - <i>S. sericans</i>	0.004

Un classement croissant de concentration en acides aminés (en mg/g de pollen lyophilisé) (Tableau 7) a été réalisé. Les espèces ont été classées dans différents groupes à l'aide des résultats du test de comparaison multiple des moyennes de Tukey (Tableau 6).

Tableau 7 : classement croissant de la concentration moyenne en acides aminés totaux des espèces de saule étudiées, classement en groupes sur base du test de comparaison multiple des moyennes de Tukey

Espèce de saule (n)	Moyenne (\pm écart-type) (mg/g de pollen lyophilisé)	Groupe	Visité par <i>Andrena vaga</i>
<i>Salix sericans</i> (3)	262,48 (\pm 17,17)	ab	NA
<i>S. udensis</i> (3)	289,75 (\pm 12,73)	bc	NA
<i>S. subopposita</i> (3)	291,3 (\pm 10,65)	bc	NA
<i>S. cinerea</i> (3)	308,24 (\pm 48,01)	abcd	Oui
<i>S. apennina</i> (3)	313,55 (\pm 18,99)	abcd	NA
<i>S. x rubens</i> (9)	317,53 (\pm 45,83)	abcd	Oui
<i>S. triandra</i> (3)	319,38 (\pm 6,66)	abcd	Oui
<i>S. irrorata</i> (3)	333,35 (\pm 22,44)	abcd	NA
<i>S. atrocinerea</i> (6)	339,73 (\pm 9,82)	abcd	Non
<i>S. dichroa</i> (3)	339,87 (\pm 9,81)	abcd	NA
<i>S. wimmeriana</i> (3)	340,77 (\pm 22,06)	abcd	NA
<i>S. caprea</i> (9)	348,57 (\pm 26,65)	cd	Oui
<i>S. alba</i> (3)	354,25 (\pm 29,4)	cd	Oui
<i>S. muscina</i> (3)	355,05 (\pm 24,74)	cd	NA
<i>S. x multinervis</i> (3)	364,25 (\pm 21,73)	cd	Non
<i>S. integra</i> (3)	374,18 (\pm 23,75)	cd	NA
<i>S. repens</i> (3)	386,11 (\pm 64,45)	ad	Non
<i>S. appendiculata</i> (3)	388 (\pm 10,24)	d	Non

Les différentes espèces ne se sont pas significativement différentes au seuil de 5%. Elles suivent un continuum et il n'est pas possible de former des groupes distincts. Cependant, certaines espèces semblent être fortement concentrées (*Salix appendiculata*, *S. repens rosmarinifolia*, *S. integra*, *S. x multinervis*, *S. muscina*, *S. alba* et *S. caprea*) tandis que d'autres sont moins concentrées (en particulier *Salix sericans* mais aussi *S. udensis* et *S. subopposita*), le reste des espèces s'échelonnant entre ces extrêmes.

5.1.1.1.2 Comparaison des profils

Pour la réalisation des analyses multivariées et plus particulièrement, l'ANOVA multivariée avec permutations, une condition d'application a été préalablement vérifiée en effectuant une ANOVA sur les distances. En l'occurrence, ce sont les distances de Bray-Curtis qui ont été utilisées, retournant une F-value de 1,687 ($p = 0,077$).

La PerMANOVA a donc été réalisée avec 1000 permutations, retournant une F-value de 11,391 et un R^2 de 0,791 ($p = 0,001$).

Enfin, des analyses de comparaisons par paire ont été utilisées (Pairwise) afin de comparer le contenu en acides aminés entre les différentes espèces de saule (le tableau complet est disponible en annexes : Tableau A1).

La PerMANOVA est illustrée par un dendrogramme (distances de Bray-Curtis, liens moyens) (Fig. 8). *Salix apennina* et *Salix udensis* semblent avoir un profil particulier (Fig. 8), différent de celui des autres espèces mais aucun groupe n'a pu être clairement formé sur base du résultat de la comparaison pair par pair (Pairwise, tableau A1 en annexe).

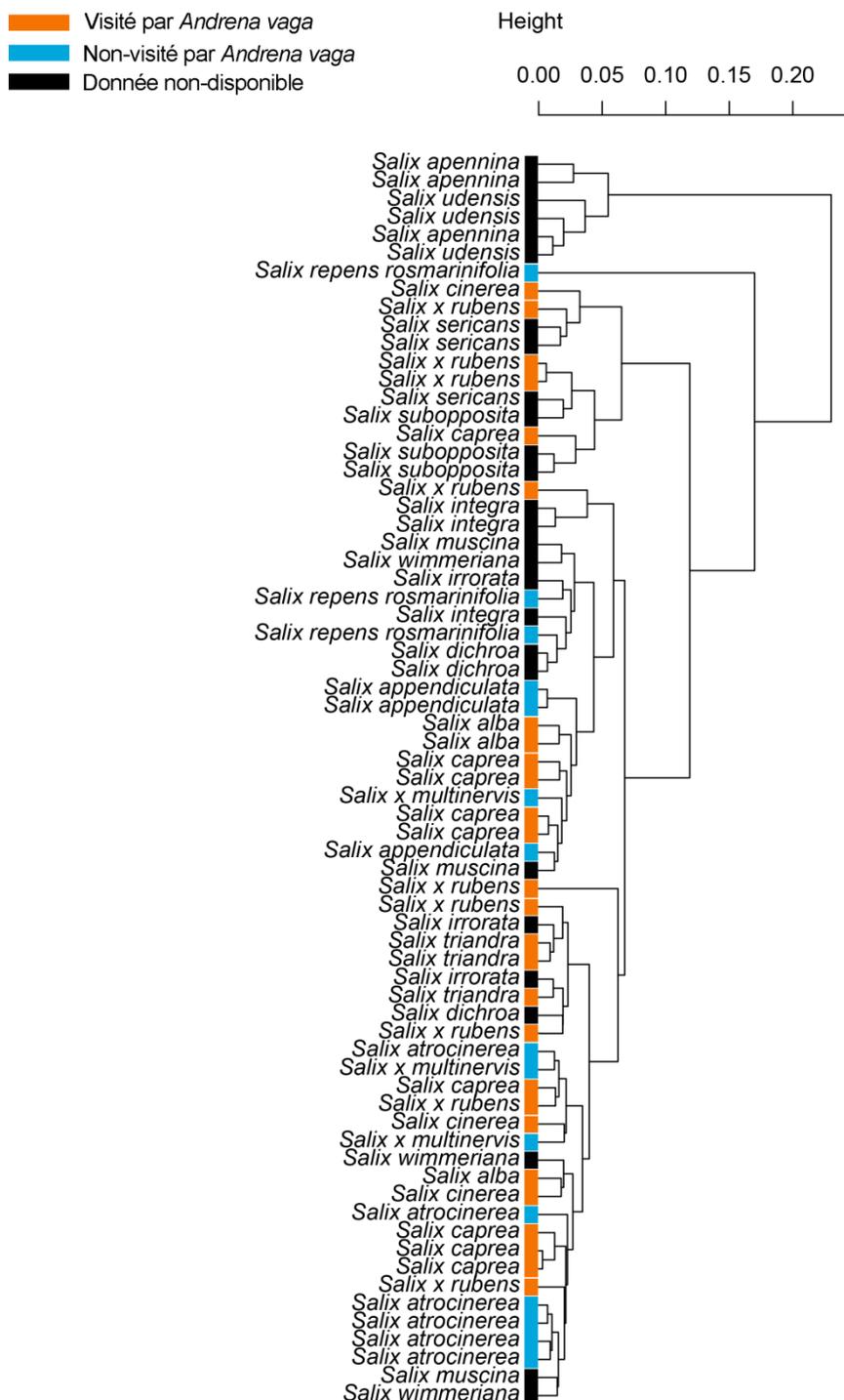


Figure 8 : dendrogramme illustrant la dissimilarité de composition des profils en acides aminés totaux des différents réplicas (basé sur une matrice de distances de Bray-Curtis et réalisé avec des liens moyens)

Aucun cluster d'espèces visitées ou non par *Andrena vaga* ne se forme sur ce dendrogramme (Fig. 8), ce qui permet d'affirmer que ce n'est pas le profil en acides aminés totaux du pollen qui explique ce choix de l'abeille.

5.1.1.2 Acides aminés essentiels

Les acides aminés essentiels ont été étudiés spécifiquement, afin de s'assurer que seuls ces acides aminés-là ne différaient pas entre les espèces de saules. Les mêmes tests statistiques ont été utilisés.

5.1.1.2.1 Comparaison globale des concentrations moyennes

Pour effectuer l'ANOVA univariée, les conditions d'application ont été également vérifiées mais n'étaient pas vérifiées pour les données non-transformées et une transformation logarithmique a à nouveau été utilisée (Normalité – test de Shapiro-Wilk : $W = 0,971$; p -value = 0,110 et Homoscédastité - test de Bartlett : Bartlett's K-squared = 26,073 ; $df = 17$; p -value = 0,073)

L'ANOVA réalisée sur les données modifiées donne le résultat significatif ($p = 0,05$) suivant : F -value = 4,473 ($p < 0,001$).

Des tests de comparaison des moyennes de Tukey ont été effectués (Tableau 8).

Tableau 8 : Paires d'espèces de saules dont les moyennes diffèrent significativement ($p < 0,05$), réalisé avec un test de Tukey, et p -value associées pour le contenu en acides aminés essentiels

Paires d'espèces de saule	Probabilité
<i>Salix sericans</i> - <i>S. alba</i>	0.008
<i>S. sericans</i> - <i>S. appendiculata</i>	< 0.001
<i>S. subopposita</i> - <i>S. appendiculata</i>	0.021
<i>S. sericans</i> - <i>S. atrocinnerea</i>	0.007
<i>S. sericans</i> - <i>S. caprea</i>	< 0.001
<i>S. sericans</i> - <i>S. dichroa</i>	0.047
<i>S. sericans</i> - <i>S. integra</i>	< 0.001
<i>S. sericans</i> - <i>S. muscina</i>	0.007
<i>S. sericans</i> - <i>S. repens rosmarinifolia</i>	< 0.001
<i>S. subopposita</i> - <i>S. repens rosmarinifolia</i>	0.023
<i>S. wimmeriana</i> - <i>S. sericans</i>	0.039
<i>S. x multinervis</i> - <i>S. sericans</i>	0.003

Il semble à nouveau que *Salix sericans* diffère de beaucoup d'autres espèces pour le contenu global en acides aminés essentiels.

Tableau 9 : classement croissant de la concentration moyenne en acides aminés essentiels des espèces de saule étudiées, classement en groupes sur base du test de comparaison multiple des moyennes de Tukey

Espèce de saule (n)	Moyenne (\pm écart-type) (mg/g de pollen lyophilisé)	Groupe	Visité par <i>Andrena vaga</i>
<i>Salix sericans</i>	145,181(\pm 8,777)	a	NA
<i>S. subopposita</i>	163,294 (\pm 5,972)	ab	NA
<i>S. udensis</i>	170,352 (\pm 7,238)	abc	NA
<i>S. cinerea</i>	171,194 (\pm 26,449)	abc	Oui
<i>S. x rubens</i>	177,540 (\pm 26,183)	abc	Oui
<i>S. triandra</i>	180,837 (\pm 3,713)	abc	Oui
<i>S. apennina</i>	183,489 (\pm 10,633)	abc	NA
<i>S. irrorata</i>	187,705 (\pm 13,276)	abc	NA
<i>S. dichroa</i>	190,389(\pm 5,617)	bc	NA
<i>S. atrocinerea</i>	191,497 (\pm 6,475)	bc	Non
<i>S. wimmeriana</i>	191,604 (\pm 13,121)	bc	NA
<i>S. caprea</i>	198,187 (\pm 15,581)	bc	Oui
<i>S. alba</i>	199,753 (\pm 16,663)	bc	Oui
<i>S. muscina</i>	200,090 (\pm 14,021)	bc	NA
<i>S. x multinervis</i>	204,293 (\pm 13,558)	bc	Non
<i>S. integra</i>	212,643 (\pm 14,144)	bc	NA
<i>S. appendiculata</i>	218,819 (\pm 6,409)	c	Non
<i>S. repens</i>	220,553 (\pm 38,528)	c	Non

5.1.1.2.2 Comparaison des profils

Une PerMANOVA a été réalisée avec 1000 permutations après vérification des conditions d'application (ANOVA sur les distances de Bray-Curtis : F-value = 1,598 ; p = 0.100) et a donné une F-value de 6,024 et un R² de 0,668 (p = 0,001).

Des analyses de comparaison par paire (Pairwise) ont été effectuées également pour les acides aminés essentiels. Les résultats sont disponibles en annexes (Tableau A2).

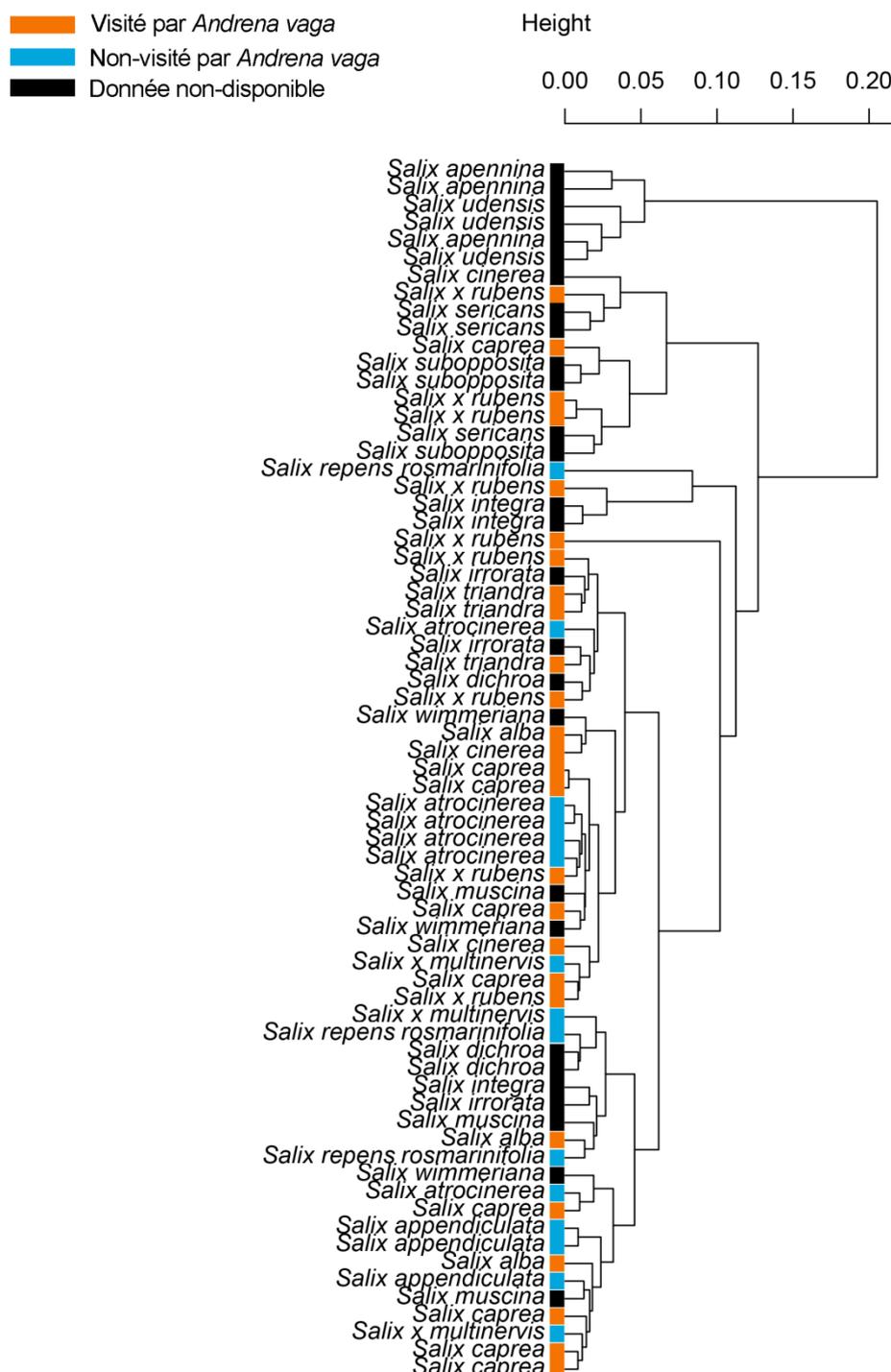


Figure 9 : dendrogramme illustrant la dissimilarité de composition des profils en acides aminés essentiels des différents réplicas (basé sur une matrice de distances de Bray-Curtis et réalisé avec des liens moyens)

Comme pour les acides aminés totaux, aucun cluster d'espèces visitées ou non par *Andrena vaga* ne se forme sur ce dendrogramme (Fig. 9). Cela laisse à penser que ce n'est pas le profil en acides aminés essentiels du pollen qui explique ce choix de l'abeille.

5.1.1.3 Recherche de composés indicateurs

Une recherche de composés indicateurs a été menée. Cela permet de déterminer si certains composés sont hautement variables et pourraient ainsi avoir une concentration typique pour une espèce donnée et ainsi faciliter l'identification en quantifiant spécifiquement ce composé et en l'occurrence : cet acide aminé (Tableau 10).

Tableau 10 : recherche de composés indicateurs parmi les acides aminés

Acide aminé	Espèce	Valeur indicatrice	Probabilité
Cystéine	<i>Salix alba</i>	0.1321	0.028
Méthionine	<i>S. apennina</i>	0.1282	0.017
Thréonine	<i>S. apennina</i>	0.0896	0.017
Tyrosine	<i>S. apennina</i>	0.0817	0.017

Il s'avère que certains acides aminés apparaissent comme potentiellement indicateurs.

Cependant, les valeurs indicatrices sont assez faibles et jugée insuffisante pour qualifier un composé d'indicateur.

5.1.2 Stérols

Les conditions d'application de l'ANOVA n'étaient pas rencontrées et c'est donc un test de Kruskal-Wallis qui a été effectué, donnant un facteur $H = 18,65$ ($p = 0,179$). La probabilité étant supérieure à un seuil de 5%, il en résulte qu'aucune différence significative n'existe entre les espèces pour leur contenu en stérols.

Les différentes espèces ont pu être classées sur base de la concentration en stérols. Cependant, aucun groupe n'a pu être formé sur base des résultats des tests de Tukey puisque aucune espèce n'est significativement différente d'une autre (Tableau 11).

Tableau 11 : classement croissant de la concentration moyenne en stérols des espèces de saule étudiées, classement en groupes sur base du test de comparaison multiple des moyennes de Tukey

Espèce de saule (n)	Moyenne (\pm écart-type) (mg/g de pollen lyophilisé)	Groupe	Visité par <i>Andrena vaga</i>
<i>S. irrorata</i> (1)	6,2		NA
<i>S. wimmeriana</i> (2)	7.8 (\pm 3.87)	a	NA
<i>S. atrocinerea</i> (6)	8.06 (\pm 0.89)	a	Non
<i>S. caprea</i> (9)	8.56 (\pm 2.19)	a	Oui
<i>S. appendiculata</i> (3)	8.66 (\pm 1.25)	a	Non
<i>S. alba</i> (5)	9.42 (\pm 1.47)	a	Oui
<i>S. muscina</i> (3)	9.76 (\pm 0.44)	a	NA
<i>S. x multinervis</i> (3)	10.03 (\pm 2.38)	a	Non
<i>S. cinerea</i> (2)	10.09 (\pm 3.79)	a	Oui
<i>S. subopposita</i> (2)	10.48 (\pm 2.25)	a	NA
<i>S. x rubens</i> (9)	12.36 (\pm 14.02)	a	Oui
<i>S. triandra</i> (3)	14.35 (\pm 6.2)	a	Oui
<i>S. dichroa</i> (3)	14.86 (\pm 7.01)	a	NA
<i>S. integra</i> (3)	15.16 (\pm 6.79)	a	NA
<i>S. repens</i> (3)	18.52 (\pm 8.87)	a	Non
<i>S. apennina</i> (0)	NA		NA
<i>S. sericans</i> (0)	NA		NA
<i>S. udensis</i> (0)	NA		NA

L'absence de groupement est également visible sur le dendrogramme (Fig. 10).

Du point de vue quantitatif, ce sont toujours les mêmes stérols qui sont majoritaires avec soit le β -sitostérol (10 fois sur 15) ou le δ^5 -avenastérol (5 fois sur 15) qui est le stérol majoritaire, l'autre étant second et ce, pour chaque espèce de saule étudiée pour ce travail et pour lesquelles l'analyse des stérols a été réalisée avec succès.

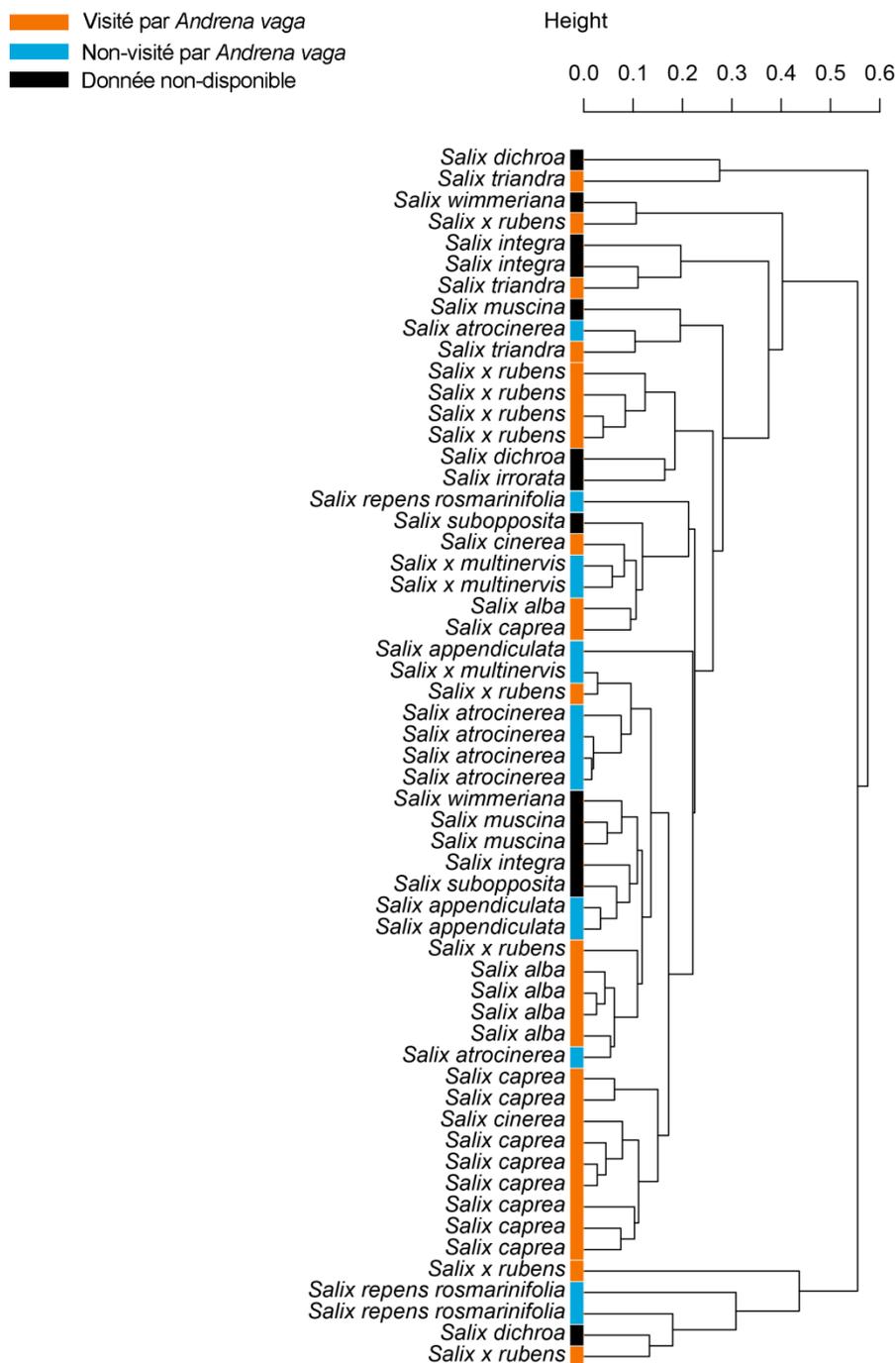


Figure 10 : dendrogramme illustrant la dissimilarité de composition des profils en stérols des différents réplicas (basé sur une matrice de distances de Bray-Curtis et réalisé avec des liens moyens)

Comme pour les deux dendrogrammes réalisés pour le profil en acides aminés totaux ou essentiels, aucun cluster d'espèces visitées ou non par *Andrena vaga* ne se forme sur ce dendrogramme (Fig. 10), ce n'est pas le profil en stérols du pollen qui explique ce choix de l'abeille.

5.1.3 Polypeptides

L'analyse des polypeptides est uniquement quantitative, c'est pourquoi, seuls des tests univariés peuvent être utilisés.

Tableau 12 : classement croissant de la concentration moyenne en polypeptides des espèces de saule étudiées, classement en groupes sur base du test de comparaison multiple des moyennes

Espèce de saule (n)	Moyenne (\pm écart-type) (mg/g de pollen lyophilisé)	Groupe	Visité par <i>Andrena vaga</i>
<i>Salix dichroa</i> (3)	31.70 (\pm 2.06)	ab	NA
<i>S. atrocinnerea</i> (6)	51.21 (\pm 24.90)	a	Non
<i>S. wimmeriana</i> (3)	52.34 (\pm 15.12)	abc	NA
<i>S. subopposita</i> (3)	70.52 (\pm 10.75)	abc	NA
<i>S. muscina</i> (3)	76.94 (\pm 18.27)	abc	NA
<i>S. udensis</i> (3)	82.44 (\pm 25.18)	abc	NA
<i>S. apennina</i> (3)	84.84 (\pm 8.39)	abc	NA
<i>S. integra</i> (3)	85.01 (\pm 16.26)	abc	NA
<i>S. appendiculata</i> (3)	85.04 (\pm 62.78)	abc	Non
<i>S. sericans</i> (3)	92.48 (\pm 9.36)	abc	NA
<i>S. cinerea</i> (3)	98.83 (\pm 52.31)	abc	Oui
<i>S. irrorata</i> (1)	114.66		NA
<i>S. repens rosmarinifolia</i> (2)	114.73 (\pm 24.23)	abc	Non
<i>S. x multinervis</i> (3)	117.67 (\pm 1.65)	abc	Non
<i>S. caprea</i> (9)	140.68 (\pm 37.64)	c	Oui
<i>S. x rubens</i> (6)	155.25 (\pm 55.41)	bc	Oui
<i>S. alba</i> (3)	189.72 (\pm 11.28)	c	Oui
<i>S. triandra</i> (0)	NA		Oui

Comme pour les deux autres catégories de nutriments, la concentration en polypeptides dans le pollen suit un continuum et ne permet pas de former des groupes parmi les espèces de saule étudiées. Toutefois, il semble que certaines espèces soient plus concentrées (*Salix alba*, *S. x rubens* et *S. caprea*) et celles-ci sont toutes visitées par *Andrena vaga* (*Salix cinerea* étant également visité mais moins concentré que les autres et les données sont manquantes pour *S. triandra*). À l'opposé, des espèces particulièrement peu concentrées sont retrouvées (*Salix dichroa* et *S. atrocinnerea*). Entre ces deux catégories, le reste des espèces a une concentration en polypeptides intermédiaire.

Tout d'abord, les conditions d'application ont été testées pour une ANOVA univariée, à savoir la normalité et l'homoscédasticité. Les données ne suivent pas une distribution normale, ce qui est démontré par un test de Shapiro-Wilk ($W = 0,963$; $p\text{-value} = 0,068$) et il

n'y a pas non plus homoscedasticité (Bartlett's K-squared = 37,801 ; df = 15 ; p-value < 0,001).

Les données ont alors été transformées en employant une fonction logarithmique mais les conditions n'étaient toujours pas rencontrées (pour la normalité : test de Shapiro-Wilk : $W = 0,974$; p-value = 0,225 et pour l'homoscedasticité test de Bartlett: Bartlett's K-squared = 34,150 ; df = 15 ; p-value = 0,003).

Il a donc été décidé d'utiliser un test de Kruskal-Wallis, test non-paramétrique d'analyse de la variance qui de ce fait ne nécessite pas la vérification des conditions d'applications. Grâce à ce test, une différence significative ($p < 0.001$) a été trouvée ($\text{Chi}^2 = 42,942$; df = 16 ; p-value < 0,001).

Par la suite, un test de comparaison multiple a été réalisé en imposant un seuil de 5%. Cinq couples sont significativement différents pour ce seuil (Tableau 13). Des seuils plus faibles de 0.01 et 0.001 ont été testés sans retourner de couple d'espèces de saule.

Tableau 13 : Paires d'espèces de saules dont les teneurs en polypeptides diffèrent significativement ($p < 0,05$) entre elles

Paires d'espèces de saule	Probabilité
<i>Salix alba-Salix atrocinerea</i>	$p < 0,05$
<i>Salix alba-Salix dichroa</i>	$p < 0,05$
<i>Salix atrocinerea-Salix caprea</i>	$p < 0,05$
<i>Salix atrocinerea-Salix x rubens</i>	$p < 0,05$
<i>Salix caprea-Salix dichroa</i>	$p < 0,05$

5.2 Parfums floraux

Il a été possible de détecter 138 composés, dont certains encore inconnus, pour les 11 espèces pour lesquelles les données ont été récoltées lors de ce travail.

Il est à noter que tous ces composés ne se retrouvent pas de manière équivalente pour toutes les espèces. En effet, on compte une moyenne de 36 composés par espèce, avec un maximum de 61 pour *Salix wimmeriana* et un minimum de 17 pour *S. irrorata* (Tableau 14).

Aucun composé volatil floral commun à toutes les espèces n'a été détecté. Cependant, certains composés sont présents dans une majorité des espèces. Les cinq composés présents dans le plus d'espèces sont repris dans le Tableau 14.

Du point de vue quantitatif, il y a des différences significatives entre les espèces, mises en évidence par la perMANOVA ($F_{51,18} = 11.174$; $R^2 = 0.79772$; $p = 0.001$).

Le composé de loin le plus abondant, toutes espèces confondues (18) (y compris celles étudiées par Füssel et al. 2007), est le 1,4-diméthoxybenzène (Fig. 11a) (26.46% de moyenne, toutes espèces confondues) suivi du trans- β -ocimène (Fig. 11b) (18.30%) et du linalool (Fig. 11c) (7.17%). Cependant, ces composés sont absents de certaines espèces, ce qui démontre la grande variabilité des parfums floraux au sein du genre *Salix*. Par exemple, le 1,4-Diméthoxybenzène est absent chez *S. alba*, *S. apennina*, *S. appendiculata*, *S. suboposita*, *S. udensis* et *S. x rubens* (la moyenne sur les espèces restante monte alors 37,91% de composition, toutes espèces confondues).

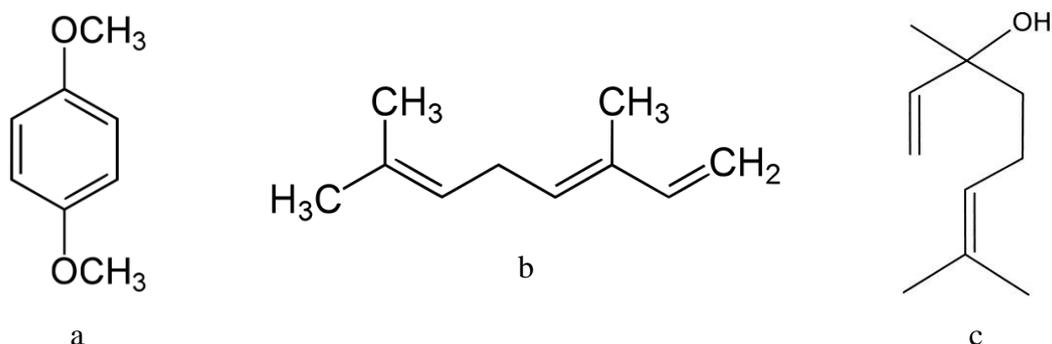


Figure 11 : Principales molécules présentes dans les parfums de saules : (a) 1,4-diméthoxybenzène (benzoïde) ; (b) trans- β -ocimène (monoterpène) ; (c) linalool (alcool terpénique)

Tableau 14 : données qualitatives sur les parfums floraux de fleurs mâles de saule : nombre de composés détectés par espèce, les 5 composés présents chez le plus d'espèces avec l'indice de rétention (présence : 1 ; absence : 0) pour les 11 espèces étudiées spécifiquement dans ce travail

Espèce de saule	Nombre de composés détectés	Composés principaux Indice de rétention associé				
		β -myrcène 992	Allo-ocimène 1132	1,3,8-p-menthatriène 1136	1,4-diméthoxybenzène 1170	Méthyl-salicylate 1205
<i>Salix apennina</i>	35	0	1	0	0	1
<i>S. dichroa</i>	46	1	1	1	1	1
<i>S. integra</i>	19	1	1	1	1	0
<i>S. irrorata</i>	17	0	0	1	1	1
<i>S. muscina</i>	47	1	1	1	1	1
<i>S. sericans</i>	35	1	1	1	1	1
<i>S. suboposita</i>	51	1	1	1	1	1
<i>S. udensis</i>	36	1	1	1	0	0
<i>S. wimmeriana</i>	61	1	1	1	1	1
<i>S. x multinervis</i>	40	0	0	1	1	1
<i>S. x rubens</i>	26	1	1	0	0	1
	38 ± 13	8	9	9	8	9
	Moyenne (± écart-type)	Somme du nombre d'espèces de saule				

5.3 Tests éthologiques

Deux modèles linéaires globaux mixtes (GLMM) ont été mis au point pour tester la durée de visite et l'attractivité des deux espèces présentées, pour les deux années de tests.

5.3.1 Première année : Tests sur des espèces similaires du point de vue de la concentration en polypeptides

Les tests éthologiques ont été mis au point au printemps 2015 avec deux espèces de saules dont le contenu en polypeptides ne différaient pas significativement ($p = 0,05$).

Ce sont *Salix x rubens* (155.3 ± 55.4 mg/g) et *Salix appendiculata* (85 ± 62.5 mg/g) qui ont été utilisés en raison de leur période de floraison qui coïncide avec l'émergence des andrènes, au mois d'avril.

5.3.1.1 Durée de visite

Pour l'influence de la durée de visite, une transformation de boxcox a été effectuée, élevant la variable à une puissance calculée pour être optimale :
Durée de visite^{-0.061} ~ Espèce de saule * Age de l'inflorescence + (1 | ID.inflorescence).

La normalité de résidus et leur dispersion ont été préalablement testés avec respectivement un test de Shapiro-Wilk sur les résidus qui démontre une normalité ($W = 0,972$; p -value = 0,506) et un test d'overdispersion qui démontre une variabilité significativement ($p > 0,05$) assez faible ($\text{Chi}^2 = 0,471$; $p = 1,000$).

C'est une ANOVA avec une approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger qui a été utilisée et elle ne démontre aucun effet de l'espèce de saule ou de l'âge de l'inflorescence (i.e. le nombre de jours depuis lesquels la branche a été prélevée) sur la durée de visite d'*Andrena vaga* (Tableau 15).

Tableau 15 : ANOVA avec approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger pour la durée de visite (2015)

Variables	F	Probabilité
Espèce de saule	1.03248	0.3177
Age de l'inflorescence	0.30291	0.5899
Espèce de saule:Age de l'inflorescence	0.46317	0.5014

5.3.1.2 Attractivité

Concernant l'attractivité, c'est une transformation logarithmique qui a été employée : $\text{Log}(\text{Nombre de visite} + 1) \sim \text{Espèce de saule} * \text{Sexe de l'andrène} + (1 | \text{Jour d'observation})$. Une ANOVA a été réalisée sur ce modèle en utilisant l'approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger (Tableau 16).

Tableau 16 : ANOVA avec approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger pour l'attractivité (2015) ; transformation en logarithme

Variables	F.value	Pr(>F)
Espèce de saule	0,281	0,609
Sexe de l'andrène	25,973	< 0 ,001 ***
Espèce de saule:Sexe de l'andrène	0,294	0,601

Le paramètre sexe de l'andrène apparait comme significatif pour le nombre de visite mais cela s'explique par le très faible nombre de visite des mâles qui sont moins nombreux que les femelles en raison de leur très court cycle de vie.

5.3.2 Deuxième année : Tests sur des espèces différent du point de vue de la concentration en polypeptides

Pour la seconde année de tests, deux espèces significativement ($p < 0,05$) différentes en contenu en polypeptides ont été sélectionnées, toujours en fonction de leur période de floraison qui coïncide avec l'émergence de *Andrena vaga*. L'espèce fortement concentrée est *Salix x rubens* (155.3 ± 55.4 mg/g) et l'espèce peu concentrée est *Salix atrocinnerea* (51.2 ± 24.9 mg/g).

5.3.2.1 Durée de visite

Une transformation en rangs a été utilisée, donnant le modèle GLMM suivant : $\text{rntransform}(\text{Durée de visite}) \sim \text{Espèce de saule} * \text{Age de l'inflorescence} + (1 | \text{ID.inflorescence})$. Les conditions d'application sont ainsi vérifiées (Shapiro-Wilk sur les résidus : $W = 0,959$; $p\text{-value} = 0,803$ et Overdispersion : $\text{Chi}^2 = 6,936$; $p = 0,436$). Une ANOVA a été réalisée sur ce modèle en utilisant l'approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger (Tableau 17).

Tableau 17 : ANOVA avec approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger pour la durée de visite (2016)

Variabiles	F.value	Pr(>F)
Espèce de saule	0.30241	0.5980
Age de l'inflorescence	0.37170	0.5774
Espèce de saule:Age de l'inflorescence	1.16161	0.3132

5.3.2.2 Attractivité

Pour mesurer l'attractivité des deux espèces de saules, ce sont les données brutes qui ont été utilisées : Nombre de visite ~ Espèce de saule * Sexe de l'andrène + (1 | Jour d'observation) afin de rencontrer les conditions d'applications ($W = 0,959$; $p\text{-value} = 0,803$ et overdispersion : $\text{Chi}^2 = 2,556$; $p\text{-value} = 0,465$). Une ANOVA a été réalisée sur ce modèle en utilisant l'approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger (Tableau 18).

Tableau 18 : ANOVA avec approximation des degrés de liberté de Kenward-Roger pour l'attractivité (2016)

Variabiles	F	Probabilité
Espèce de saule	2.4	0.2191
Sexe de l'andrène	5.4	0.1027
Espèce de saule:Sexe de l'andrène	0.6	0.4950

Aucun effet significatif n'a pu être décelé grâce à ce test et il semble qu'il n'y ait pas de différence d'attractivité entre les deux espèces de saules testées, même si les probabilités sont plus faibles pour ces test-ci concernant l'espèce de saule que pour les tests réalisés la première année (Tableau 16) sur des espèces de saules qui n'avaient pas un contenu en polypeptide significativement différent.

5.4 Phylogénie

5.4.1 Phylogénie du genre *Salix*

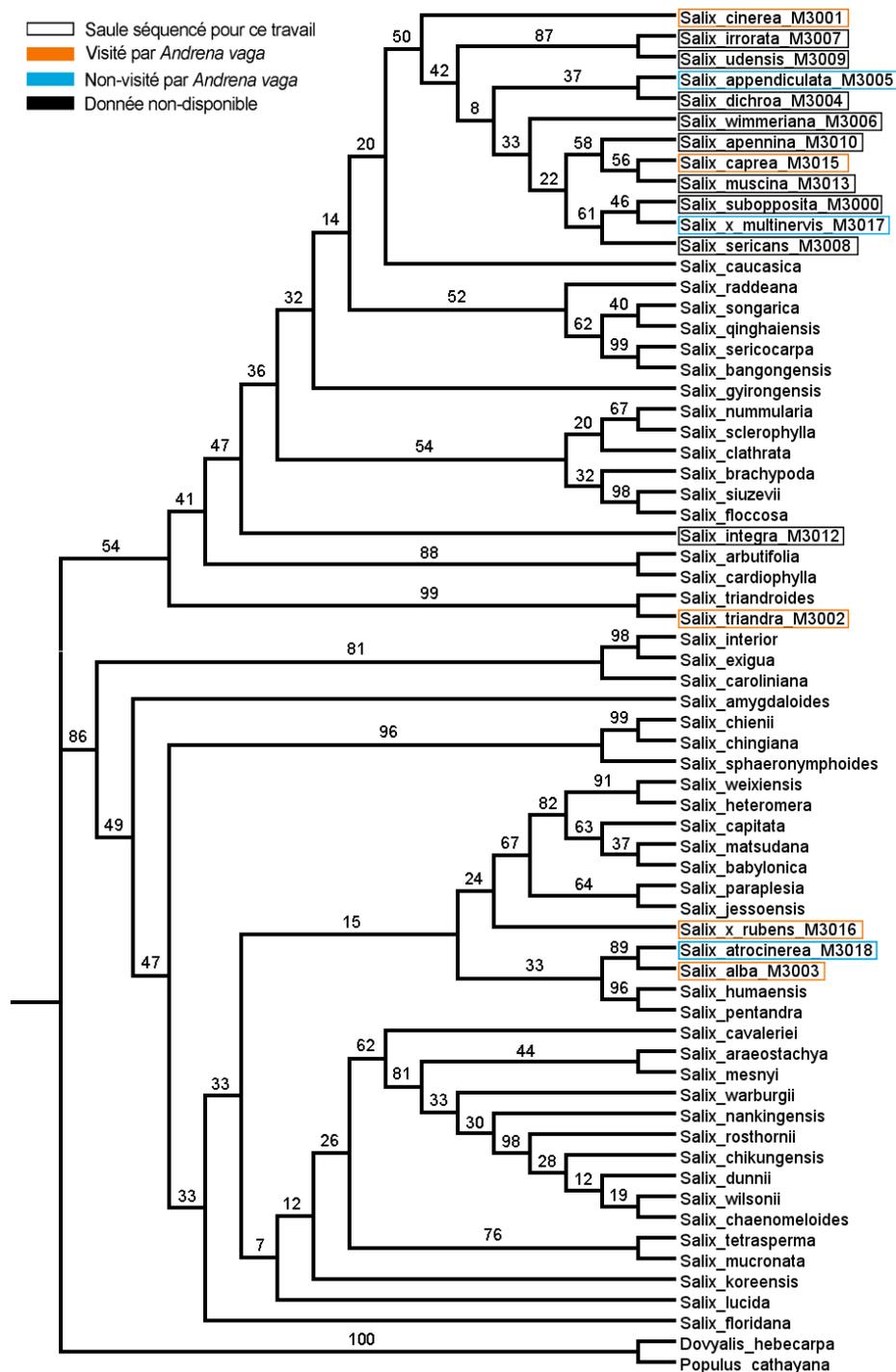


Figure 12 : phylogénie du genre *Salix* L. avec les espèces étudiées encadrées (en orange si elles sont visitées par *Andrena vaga*, en bleu si ce n'est pas le cas et en noir si les données ne sont pas disponibles), réalisée avec la méthode de maximum de vraisemblance, les nombres correspondent aux valeurs de bootstrap pour chaque branche

Deux grands clades de saules se dessinent sur l'arbre phylogénétique réalisé (Fig. 12). L'un d'entre eux compte 34 espèces et contenant une minorité des espèces étudiées ici (3/17), est bien soutenu à la base avec une valeur de bootstrap de 86%, tandis que l'autre, qui compte 30 espèces dont presque la moitié sont des espèces étudiées (14), l'est moins avec seulement 54%. À l'intérieur de ces clades, les différentes associations d'espèces sont plus ou moins bien soutenues par les valeurs de bootstrap. La résolution de l'arbre ne permet cependant pas de déterminer lequel de ces deux grand groupes est basale et plus proche des outgroups (i. e. *Populus cathayana* et *Dovyalis hebecarpa*) choisis pour l'étude.

5.4.2 Phylogénie des espèces de saule étudiées

Afin de mieux appréhender les relations entre les espèces étudiées spécifiquement pour ce travail, un arbre regroupant uniquement ces espèces a également été construit (Fig. 13) et en utilisant du character mapping pour les données de visite d'*Andrena vaga*, réalisée également avec la méthode de maximum de vraisemblance.

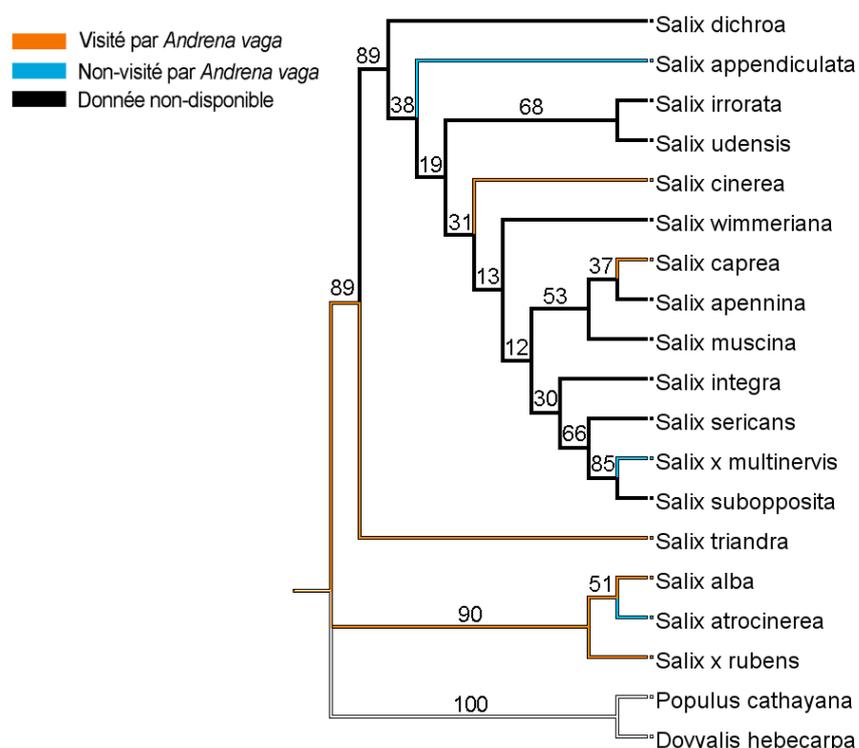


Figure 13 : phylogénie du genre *Salix* L. avec uniquement les espèces utilisées dans cette étude (méthode de maximum de vraisemblance) avec character mapping (maximum de vraisemblance) de la visite d'*Andrena vaga*, visité en orange, non visité en bleu, out-group en blanc et NA en noir, les nombres correspondent aux valeurs de bootstrap pour chaque branche

La visite d'*Andrena vaga* sur certaines espèces de saule n'est pas liée à la phylogénie. Il n'y a pas de logique évolutive phylogénétique apparente pour les espèces étudiées au sein du genre *Salix* (Fig. 13). Les mêmes observations sont faites concernant les valeurs de bootstrap que pour le premier arbre (Fig. 12), à savoir que les clades ne sont pas tous bien soutenus.

5.4.3 Character mapping de contenu nutritionnel du pollen

5.4.3.1 Acides aminés

Le contenu en acides aminés n'est pas lié aux affinités phylogénétiques entre les espèces du genre *Salix*. Il n'y a pas non plus de corrélation entre les espèces visitées par *Andrena vaga* et la concentration en acides aminés (Fig. 14).

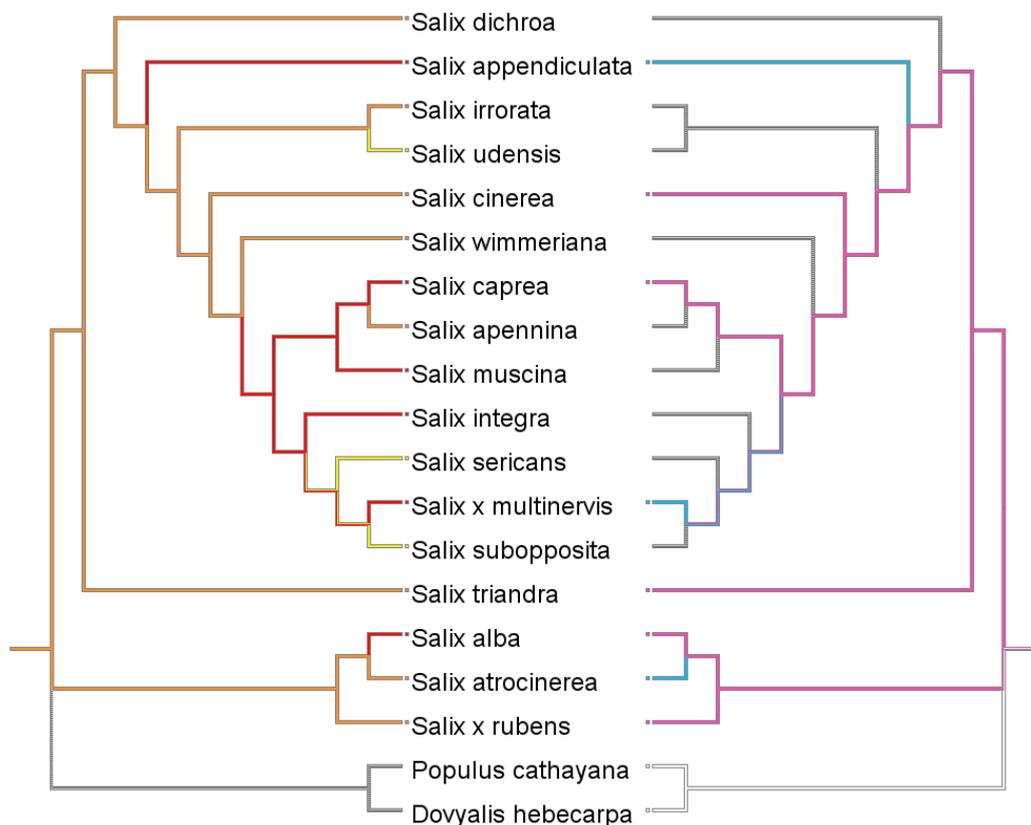


Figure 14 : phylogénie du genre *Salix* L. avec uniquement les espèces utilisées dans cette étude avec character mapping (maximum de vraisemblance) à gauche : concentration en acides aminés, classée en 3 catégories : forte concentration (de 348 à 388 mg/g de pollen lyophilisé) (rouge), concentration moyenne (de 308 à 341 mg/g de pollen lyophilisé) (orange), faible concentration (de 262 à 292 mg/g de pollen lyophilisé) (jaune) et NA en gris et à droite : visite d'*Andrena vaga*, visité en rose, non-visité en bleu, out-group en blanc et NA en gris

5.4.3.2 Polypeptides

Pour le contenu en polypeptides, il ne semble pas non plus qu'il y ait une logique phylogénétique. Par contre qu'il y ait une corrélation, comme déjà souligné précédemment, entre une haute concentration en polypeptides et la visite d'*Andrena vaga* sur certaines espèces de saule (Fig. 15).



Figure 15 : phylogénie du genre *Salix* L. avec uniquement les espèces utilisées dans cette étude avec character mapping (maximum de vraisemblance) à gauche : concentration en polypeptides, classée en 3 catégories : forte concentration (de 31 à 51.5 mg/g de pollen lyophilisé) (rouge), concentration moyenne (de 52 à 118 mg/g de pollen lyophilisé) (orange), faible concentration (de 140 à 190 mg/g de pollen lyophilisé) (jaune) et NA en gris et à droite : visite d'*Andrena vaga*, visité en rose, non-visité en bleu, out-group en blanc et NA en gris

Le character mapping réalisé dans cette étude (Fig. 14 et Fig. 15) permet de regrouper diverses informations et de souligner la variabilité des traits chimiques du pollen étudié mais aussi concernant la visite d'*Andrena vaga* sur ses plantes hôtes.

6 Discussion

6.1 Variabilité des traits floraux et phylogénie

D'après les résultats obtenus, il semble clair qu'il y a une grande variation dans la composition chimique du pollen des différentes espèces de saules. Cette différence est fortement marquée pour les polypeptides mais elle l'est aussi pour les acides aminés, tandis qu'elle est plus faible et significative pour les stérols.

Cette étude montre également que les parfums des saules ne sont pas strictement corrélés avec le contenu nutritionnel du pollen et ce, même si des différences significatives ont été trouvées entre les molécules émises par les fleurs mâles.

Concernant le lien entre ce contenu et la phylogénie, il y a très peu de données disponibles dans la littérature. Roulston (2000) a mis en évidence que le contenu en polypeptides variait peu au sein d'un genre végétal mais aucune étude ne détaille l'évolution de la variation de ces traits au niveau intragénique. Dans le cas étudié ici, cette variation est graduelle mais belle et bien présente mais ne suit aucune logique phylogénétique apparente.

En ce qui concerne les acides aminés, le même type de constat a été effectué par Weiner et al. (2010). En effet, le contenu en acides aminés varie entre les groupes taxonomiques mais peu au sein d'un même genre. Dans le cas des saules, il semble que cette variation soit tout de même assez marquée, bien que ce soit à nouveau un continuum.

Pour les stérols, aucune information n'est disponible dans la littérature mais il semble que la variation soit moins importante et qu'il y ait une conservation au niveau interspécifique cette fois-ci.

Les parfums floraux, qui sont des composés secondaires (i. e. non-essentiel au métabolisme de base) (Schoonhoven 1972) contrairement aux éléments nutritifs étudiés dans le pollen, correspondent à une réalité taxonomique en ce qui concerne les molécules émises et l'intensité de cette émission (Jürgens et al. 2003, Jürgens 2004, Jürgens and Dötterl 2004). Cependant, cette similarité entre composés proches phylogénétiquement parlant n'est valable que jusqu'au niveau générique car au niveau interspécifique, cela varie beaucoup. En effet, quelques groupes présentent une faible variation mais pour d'autres, elle est nettement plus marquée (Dahl et al. 1990, Tollsten and Bergström 1993, Knudsen and Ståhl 1994, Dobson et

al. 1997, Kite et al. 1998, Ervik et al. 1999). Le genre *Salix* entre donc dans la deuxième catégorie, avec une variation assez marquée entre les espèces.

L'évolution de ces traits chimiques (i. e. chimie du pollen et parfums) n'est par ailleurs pas similaire entre eux et semble avoir évolué indépendamment entre les différentes espèces.

6.2 Syndrome de pollinisation et traits chimiques du pollen et volatils

De plus, les parfums floraux des saules sont trop variables pour être impliqués dans la sélection qu'effectue *Andrena vaga*, bien qu'ils jouent un rôle dans l'attraction des abeilles à distance (Dötterl et al. 2005). Il semble également peu probable que les traits visuels (i. e. couleur et forme) des fleurs puissent être un facteur influençant la sélection de l'hôte chez *A. vaga* car les inflorescences du genre *Salix* présentent des caractères intermédiaires entre des syndromes de pollinisation anémophile et entomophile avec une absence de périanthe (Feagri et van der Pijl 1979, Proctor et al. 1996).

D'autres traits du grain de pollen tels que la présence de pollenkitt ou la texture, peuvent apporter des informations de reconnaissance de la qualité et ou de la quantité de pollen (Piskorski et al. 2011). Par exemple, Hesse (1979a, b, c) a observé que le pollen de plantes anémophiles avait tendance à avoir un pollenkitt avec une surface moins collante que celui des espèces zoophiles proches. Il semble donc logique que le pollen de plantes pollinisées par les animaux aient un pollenkitt plus abondant en général et que cette abondance attire les insectes palynophages (Roulston and Cane 2000). De la même manière, la composition en polypeptides pourrait influencer la texture de la ressource alimentaire et rendre celle-ci plus ou moins attractive (Cohen 2004).

De plus et bien que Pernal et Currie (2002) fassent état que l'utilisation de récepteurs oraux alimentaires soit peu probable, Whitehead et Larsen (1976) ont émis l'hypothèse que des sensilles gustatives sur la bouche de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) puissent être sensibles aux polypeptides (de Brito Sanchez 2011 et références internes). Cette étude fournit donc les premières preuves que le contenu en polypeptides peut agir comme un signal pour les insectes spécialisés sur les saules et permet de discriminer les hôtes avec un pollen adapté, des autres au sein du genre *Salix*.

Le contenu nutritionnel du pollen ne semble pas être corrélé aux affinités phylogénétiques présentes entre les espèces de saule étudiées. C'est donc vraisemblablement une pression évolutive externe qui tend à faire varier ce contenu nutritif au sein du genre *Salix*. Par ailleurs, les différences observées sont graduelles avec un continuum entre les espèces mais qui n'est pas corrélé avec les affinités phylogénétiques au sein du genre *Salix*.

Comme cela a déjà été étudié pour quatre espèces de saule par Karrenberg et al. (2002), il semble que le caractère entomophile soit basal dans le genre *Salix* et le caractère anémophile, dérivé. Cependant, il serait vraiment important d'obtenir les informations concernant la visite d'*Andrena vaga* pour toutes les espèces étudiées ici, afin d'établir si cette vérité se vérifie pour cette abeille solitaire et spécialisée sur le genre *Salix*.

De plus, d'après Hanley et al (2008), une bonne qualité nutritionnelle des récompenses florales (mesurée avec la concentration en protéines) est liée au choix floral exercé par les bourdons. Ainsi, le pollen de fleurs entomophiles examinées contenait moins de polypeptides que celui d'espèces entomophiles.

La composition en acides aminés et en stérols ne semble pas être liée au mode de pollinisation des saules par *Andrena vaga* puisque la distribution des espèces visitées ou non par cette abeille suivant ce critère ne laisse transparaître aucun motif, contrairement à ce qu'il a pu être observé avec les polypeptides.

Le fait que les polypeptides puissent guider une relation plante-abeille peut être mis en lien avec le fait que les abeilles soient, selon plusieurs études, capables de détecter et sélectionner le pollen récolté en fonction de sa qualité nutritionnelle (Rasheed and Harder 1997, Robertson et al. 1999, Hanley et al. 2008). D'après diverses observations (données non-publiées), *Andrena vaga* ne collecte pas de pollen de deux espèces de saules ayant une concentration en polypeptides particulièrement faible, comparativement aux autres espèces : *Salix appendiculata* et *S. atrocinerea*. Il semblerait donc que ce critère puisse influencer le choix de cette abeille oligolectique pour sa source nutritionnelle.

La question de la détection de cette différence de qualité nutritionnelle est bien entendu essentielle. Il se trouve qu'elle est au cœur d'un débat assez intense entre les auteurs car certains estiment que les pollinisateurs peuvent différencier activement leurs ressources florales sur base de ce critère (Roulston et al. 2000, Dobson et al. 1996) et d'autres démontrent qu'une discrimination sur base des composés volatiles émis est possible (Dobson

1987, Dobson et al. 1996). Cependant, d'autres études s'opposent à cette vraisemblable annonce des plantes et détection des pollinisateurs via les composés volatils avec des variabilités présentes, même au sein d'une même espèce (Piskorski et al. 2011).

Il est également à noter que d'autres composants peuvent intervenir dans l'interaction de pollinisation. En effet, le nectar est une autre récompense florale et source nutritive pour les insectes.

6.3 Tests éthologiques et ressource alimentaire

Les tests éthologiques de choix alimentaires n'ont pas permis de démontrer de manière significative, sûrement par manque de répliques d'observation, qu'*Andrena vaga* aille préférentiellement sur une espèce plus riche en polypeptides qu'une autre et ce, même si une tendance semble se dessiner, comparativement aux tests menés avec deux espèces non-significativement différentes en contenu polypeptidique.

Cependant, de tels tests sur des abeilles menés en milieu naturel ne sont pas chose courante. Il pourrait être possible qu'*Andrena vaga* n'ait pas bien répondu au test (i. e. peu de visite compte tenu du temps de test et de la taille de la population) pour plusieurs raisons. La première serait la tendance que les abeilles ont à se limiter à une même ressource florale, malgré la présence d'autres à proximité (Dukas 1993). Comme cela a été démontré par Riffell et al. (2008) pour les sphinx, il peut y avoir un changement d'une plante hôte à une autre lorsque l'abondance relative des deux plantes change. Cela explique également en partie une deuxième raison du faible succès du dispositif expérimental puisque les bouquets présentés aux andrènes n'étaient constitués au plus que de 100 inflorescences alors que certaines espèces de saules peuvent en porter plusieurs milliers (Molina et al. 1996, Karrenberg et al. 2002).

7 Conclusion

Les résultats obtenus avec cette étude démontrent la présence d'une grande variabilité du pollen de saule en termes de contenu nutritionnel. Cette variation n'est par ailleurs pas corrélée aux parfums floraux qui n'annoncent donc pas la qualité nutritive de la ressource pollinique.

Ces traits chimiques ne sont pas liés à un signal phylogénétique, pas plus que la visite d'*Andrena vaga* sur ses espèces hôtes de prédilection. Il semble donc que les raisons de l'interaction entre cette abeille et le genre *Salix* soient apparues ponctuellement et de manière indépendante, suite à une pression évolutive entre certaines espèces de saules et *A. vaga*.

Par ailleurs, il semble que les polypeptides soient liés à la pollinisation du genre *Salix* en étant impliqués dans l'interaction avec *A. vaga*. En effet, la concentration en polypeptides semble agir comme un filtre floral et permettre à l'abeille de reconnaître ses hôtes. Ce trait pourrait donc être ajouté au syndrome de pollinisation.

Les tests éthologiques n'ont par contre pas permis de démontrer cette hypothèse avec certitude et demandent donc à être complétés en vue d'éclaircir les raisons des choix effectués par *A. vaga* en situation naturelle.

Cette étude met également en évidence la capacité d'*A. vaga* à s'adapter à des taux variables d'acides aminés et de stérols. Cette plasticité pourrait permettre d'introduire un nouvel hôte adapté à ses besoins si les associations actuelles venaient à être mises en péril (Haider et al. 2013).

8 Perspectives

Ce travail ouvre des perspectives assez larges. En effet, il serait très intéressant d'investiguer d'autres espèces de saules pour compléter les données concernant ce genre végétal et étudier d'autres insectes s'en nourrissant, qu'ils soient généralistes ou spécialistes.

Il serait également primordial d'étudier l'autre ressource alimentaire puisée par les abeilles : le nectar car cela pourrait expliquer, au moins en partie, le choix de l'espèce spécialiste *Andrena vaga* de visiter certaines espèces de saule et pas d'autres.

De plus, la surface du grain du pollen, le pollenkitt, pourrait aussi jouer un rôle dans l'interaction étudiée ici puisque cette partie entre en contact avec l'abeille et pourrait donc permettre une reconnaissance des hôtes par *A. vaga*.

De plus amples investigations pourraient avoir lieu en ce qui concerne les tests éthologiques. Il faudrait alors augmenter le nombre d'observations mais également proposer d'autres espèces de saules à *A. vaga* et éventuellement développer des tests avec plus de deux espèces potentiellement hôtes présentées simultanément.

La présence d'autres molécules, comme des composés secondaires dans les ressources alimentaires, pourrait également faire l'objet de travaux dans la continuité de cette étude puisque ces molécules pourraient contribuer à l'interaction en la favorisant pour les hôtes effectivement visités par *A. vaga* ou en l'inhibant pour ceux qui ne le sont pas.

9 Références

Akihisa, T., Kokke, W.C.M.C. and Tamara T. (1991). *Physiology and biochemistry of sterols, chapter 7.* Glenn W. Patterson and W. David Nes.

Aladjov, H. (2011). Intuitionistic Fuzzy Estimations of Biological Interactions. *Notes on*

Argus, W.G. (2007). *Salix* (Salicaceae) distribution maps and a synopsis of their classification in North America, North of Mexico. *Harvard Papers in Botany*, Vol. 12, No. 2, 2007, pp. 335–368.

Atlashymenoptera. 25 mai 2015. www.atlashymenoptera .net

Baldwin, B. G., & Markos, S. (1998). Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S–26S rDNA: Congruence of ETS and ITS Trees of Calycadenia (Compositae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 10(3), 449-463.

Bellmann, H. (1999). *Guide des abeilles, bourdons, guêpes et fourmis d'Europe. L'identification, le comportement, l'habitat.* Delachaux et Niestlé.

Bischoff, I., Feltgen K., & Breckner D. (2003). Foraging Strategy and Pollen Preferences of *Andrena vaga* (Panzer) and *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 12 (2) : 220-237.

Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., & White, J. S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 24(3), 127-135.

Behmer, S.T. and Nes, W.D. (2003). Insect sterol nutrition and physiology: a global overview. *Advances in Insect Physiology*, 31 : 1-72.

Brodscheider, R., and Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41 : 278-294.

Brothers, D.J. and Carpenter, J.M. (1993). Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea. *Journal of Hymenoptera Research* 2: 227-301.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Burger, H., Ayasse, M., Häberlein, C.M., Schulz, S. and Dötterl, S. (2010b). *Echium* and *Pontechium* specific floral cues for host-plant recognition by the oligolectic bee *Hoplitis adunca*. *South African Journal of Botany*, 76: 788-795.

Burger, H., Dötterl, S. and Ayasse, M. (2010a). Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology*, 24: 1234-1240.

Cane, J.H. and Sipes, S.D. (2006). Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty. *Plant-pollinator interactions from specialization to generalization* (Waser N.M. & Ollerton J. 2006), pp. 99-122. The University of Chicago Press, Chicago.

Chiang, T. Y., Schaal, B. A., & Peng, C. I. (1998). Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39.

Cohen, A.C. (2004). *Insect Diet: Science and Technology*. CRC, Boca Raton, Florida, USA.

Dahl, Å. E., Wassgren, A-B., Bergström, G. (1990). Floral scents in *Hypecoum* sect. *Hypecoum* (Papaveraceae): Chemical composition and relevance to taxonomy and mating system. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18:157-168.

Danforth, B. N., Fang J. and Sipes, S.D. (2006). Analysis of family level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39 : 358-372.

de Brito Sanchez, M.G. (2011). Taste perception in honey bees. *Chemical Senses* 36(8) : 675–692.

De Groot, A.P. (1953). Protein and Amino Acid Requirements of the Honey bee (*Apis mellifera*). *Physiologia Comparata et d'Ecologia*, 3 : 197-285.

Dobson, H. E. M. (1987). Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia*, 72: 618-623.

Dobson, H. E. M., Arroyo, J., Bergström, G., Groth, I. (1997). Interspecific variation in floral fragrances within the genus *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25:685-706.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Dobson, H.E.M., Groth, I. and Bergstrom, G. (1996). Pollen advertisement: chemical contrast between whole-flower and pollen odours. *American Journal of Botany*, 83: 877-885.

Dötterl, S., Füssel, U., Jürgens, A. and Aas, G. (2005). 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 2993-2998.

Dötterl, S. and Vereecken, N.J. (2010). The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: A review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology*, 88: 668-697.

Dukas, R. and Real, L.A. (1991). Learning foraging tasks by bees: a comparison between social and solitary species. *Animal Behavior*, 42, 269-276.

Dukas, R., & Real, L. A. (1993). Learning constraints and floral choice behaviour in bumble bees. *Animal Behaviour*, 46(4), 637-644.

Ervik, F., Tollsten, L., Knudsen, J. T. (1999). Floral scent chemistry and pollination ecology in phytelephantoid palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 217:279-297.

Faegri, K. and van der Pijl, L. (1979). The principles of pollination ecology. 3rd ed. Pergamon Press, Oxford, U.K.

Fénart, S., Touzet, P., Arnaud, J. F., & Cuguen, J. (2006). Emergence of gynodioecy in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima* L.): a genealogical approach using chloroplastic nucleotide sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273(1592), 1391-1398.

Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R. and Thomson, J.D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review Ecology Evolution Systematic*, 35:375–403.

Füssel, U., Dötterl, S., Jürgens, A. and Aas, G. (2007). Inter- and intraspecific variation in floral scent in the genus *Salix* and its implication for pollination. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 749-765.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Gosselin, M., Michez, D., Vanderplanck, M., Roelants, D., Glauser, G., and Rasmont, P. (2013). Does *Aconitum septentrionale* chemically protect floral rewards to the advantage of specialist bumblebees? *Ecological Entomology*, 38(4): 400-407.

Haider, M., Dorn, S. and Müller, A. (2013). Intra- and interpopulational variation in the ability of a solitary bee species to develop on non-host-pollen: implications for host range expansion. *Functional Ecology*, 27: 255-263.

Hanley, M.E., Franco, M., Pichon, S., Darvill, B. and Goulson, D. (2008). Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants. *Functional Ecology*, 22: 592-598.

Hesse, M. (1979a). Development and ultrastructure of the exine and sticky substance of the pollen in closely related entomophilous and anemophilous angiosperms: Polygonaceae. *Flora*, 168: 558-577.

Hesse, M. (1979b). Development and ultrastructure of the exine and the sticky substance of the pollen in closely related entomophilous and anemophilous angiosperms: Salicaceae, Tiliaceae and Ericaceae. *Flora*, 168: 540-557.

Hesse, M. (1979c). Ultrastructure and distribution of pollenkitt in insect- and wind-pollinated Acer. *Plant Systematics and Evolution*, 131: 277-289.

Hesse, M. (2000). Pollen wall stratification and pollination. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 1–17.

Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie Végétale*. DE Boeck.

Intuitionistic Fuzzy Sets, Vol. 17 (2011), 4, 29–38

Irwin, R.E., Bronstein, J.L., Manson, J.S. and Richardson, L. (2010). Nectar Robbing: Ecological and Evolutionary Perspectives. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Abstract Systematics*. 41:271–92

Janz, N. and Nylin, S. (2008). The oscillation hypothesis of host-plant range and speciation Pages 203-215 in K.J. Tilmon, editor. *Specialization, speciation, and radiation. The evolutionary biology of herbivorous insects*. University of California Press, Berkeley.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Johnson, S. D., & Steiner, K. E. (2000). Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(4), 140-143.

Jürgens, A., (2004). Flower scent composition in diurnal *Silene* species (Caryophyllaceae): Phylogenetic constraints or adaptation to flower visitors? *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:841-859.

Jürgens, A., Dötterl, S. (2004). Chemical composition of anther volatiles in Ranunculaceae: Genera-specific profiles in *Anemone*, *Aquilegia*, *Caltha*, *Pulsatilla*, *Ranunculus*, and *Trollius* species. *American Journal of Botany*, 91:1969-1980.

Jürgens, A., Witt, T., Gottsberger, G., (2003). Flower scent composition in *Dianthus* and *Saponaria* species (Caryophyllaceae) and its relevance for pollination biology and taxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31:345-357.

Kallenbach, M., Bonaventure, G., Gilardoni, P.A., Wissgott, A. and Baldwin, I.T. (2012). *Empoasca* leafhoppers attack wild tobacco plants in a jasmonate-dependent manner and identify jasmonate mutants in natural populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (24): 1548-1557.

Karrenberg, S., Kollmann, J., Edwards, P.J. (2002). Pollen vectors and inflorescence morphology in four species of *Salix*. *Plant Systematics and Evolution* 235:181-188.

Kay, Q.O.N. (1985). Nectar from willow catkins as a food source for blue tits. *Bird Study* 32:40-44.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Kempf, M., Heil, S., Hasslauer, I., Schmidt, L., von der Ohe, K., Theuring, C., Reinhard, A., Schreier, P. and Beuerle, T. (2010). Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(2):292-300.

Kevan, P.G. (1972). Floral colors in the high arctic with reference to insect-flower relations and pollination. *Revue canadienne de botanique*, 50(11): 2289-2316, 10.1139/b72-298.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Kite, G. C., Hettterscheid, W. L. A., Lewis, M. J., Boyce, P. C., Ollerton, J., Cocklin, E., Diaz, A., Simmonds, M. S. J. (1998). Inflorescence odours and pollinators of *Arum* and *Amorphophallus* (Araceae). In : Owens, S. J., Rudall, P. J. (eds). *Reproductive Biology in Systematics, Conservation and Economic Botany*. Royal Botanic Gardens, Kew, p 295.

Knudsen, J. T., Ståhl, B. (1994). Floral odour in the Theophrastaceae. *Biochemical Sytematics and Ecology*, 22:259-268.

Lambinon, J., Delvosalle, L. et Duvigneaud, J. (2004). *Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes)*. Cinquième édition. Meise, Jardin botanique national de Belgique.

Lidforss, B. (1899). Weitere beiträge zur biologie des pollens. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanike*, 33: 232-312.

Linsley, E.G. (1958). The ecology of solitary bees. *Hilgardia*, 27: 543-599.

Michener, C.D. (1954). Records and descriptions of North American megachilid bees. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 27: 65-78.

Michener, C.D. (1979). Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66: 277-347.

Michener, C.D. (2007). *The bees of the world, second edition*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Milet-Pinheiro, P., Ayasse, M., Schlindwein, C., Dobson, H.E.M. And Dötterl, S. (2012). Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. *Behavioral Ecology*, 23(3):531-538.

Minckley, R.L. and Roulston, T.H. (2006). Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. Pages 69-98 in N.M. Waser and Ollerton, J., editors. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. The University of Chicago Press, Chicago and London.

Moldenke, A.R. (1979). Host-plant coevolution and the diversity of bees in relation to the flora of North America. *Phytologia*, 43: 357-419.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Molina, R. T., Rodríguez, A. M., Palaciso, I. S., & López, F. G. (1996). Pollen production in anemophilous trees. *Grana*, 35(1), 38-46.

Morris, W.F. (1996). Mutualism denied? Nectar-robbing bumble bees do not reduce female or male success of bluebells. *Ecology*, 1451-1462.

Müller, A. (1996). Host-plant specialization in western palearctic Anthidiine bees (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae). *Ecological Monographs*, 66: 235-257.

Müller, A. and Kuhlmann, M. (2008). Pollen hosts of western palaeartic bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae): the Asteraceae paradox. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95: 719-733.

Negrón-Ortiz, V., Watson, L.E., (2002). Molecular phylogeny and biogeography of *Erithalis* (Rubiaceae), an endemic of the Caribbean basin. *Plant Syst. Evol.* 234, 71–83.

Nepi, M. and Franchi, G.G. (2000). Cytochemistry of mature angiosperm pollen. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 45-62.

Ollerton, J., Alarco, R., Waser, N.M., Price, M.V., Watts, S., Cranmer, L., Hingston, A., Peter, C.I. and Rotenberry, J. (2009). A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany*, 103: 1471 – 1480.

Petanidou, T. and Vokou, D. (1990). Pollination and pollen energetics in Mediterranean ecosystems. *American Journal of Botany*, 77: 986–992.

Pilorget, L., Buckner, J. and Lundgren, J.G. (2010). Sterol limitation in a pollen-fed omnivorous lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Insect Physiology*, 56: 81-87.

Piskorski, R., Kroder, S. and Dorn, S. (2011). Can pollen headspace volatiles and pollenkitt lipids serve as reliable chemical cues for bee pollinators? *Chemistry and Biodiversity*, 8 (4): 577-586.

Praz, C.J., Müller, A. and Dorn, S. (2008). Specialized bees fail to develop on non-host pollen: do plants chemically protect their pollen? *Ecology*, 89: 795–804.

Proctor, M., Yeo, P. and Lack, A. (1996). The natural history of pollination. Harper Collins, London.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Rasheed, S.A. and Harder, L.D. (1997). Economic motivation for plant species preferences of pollen-collecting bumble bees. *Economic Entomology*, 22: 209-219.

Rasmont, P., Barbier, Y., Terzo, M. et Iserbyt, S. (2009). Clé des principaux ordres d'insectes d'Europe. (*Non publié*)

Raven, P.H., Johnson G., Mason, K., Losos, J. et Singer, S.R. (2011). *Biologie, Chapitre 30.* DE Boeck.

Riffell, J. A., Alarcón, R., Abrell, L., Davidowitz, G., Bronstein, J. L., & Hildebrand, J. G. (2008). Behavioral consequences of innate preferences and olfactory learning in hawkmoth–flower interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), 3404-3409.

Robertson, C. (1899). Flowers and insects. *Botanical Gazette*, 28: 27-45.

Robertson, C. (1925). Heterotrophic bees. *Ecology*, 6: 412-436.

Robertson, A.W., Mountjoy, C., Faulkner, B.E., Roberts, M.V. and Macnair, M.R. (1999). Bumblebee selection of *Mimulus guttatus* flowers: the effects of pollen quality and reward depletion. *Ecology*, 80: 2594-2606.

Roulston, T.H. and Cane, J.H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 187-209.

Roulston, T.H., Cane, J.H. and Buchmann, S.L. (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs*, 70: 617-643.

Schoonhoven, L., (1972). Secondary plant substances and insects. *Recent Advances in Phytochemistry*, 5:197-224.

Sedivy, C., Müller, A. and Dorn, S. (2011). Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet: evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Functional Ecology*, 25 (3): 718-725.

Stebbins, L. L. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: Pollination mechanism. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1:307-326.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Svoboda, J.A., Herbert E.W.Jr., Thompson M.J. and Feldlaufer, M.F. (1986). Selective sterol transfer in the honey bee: its significance and relationship to other Hymenoptera. *Lipids*, 21: 97-101.

Thorp, R.W. (1969). Systematics and ecology of bees of the subgenus *Diandrena* (Hymenoptera: Andrenidae). *University of California Publications in Entomology*, 52: 1-146.

Tollsten, L., Bergström, L. G., (1993). Fragrance chemotypes of *Platanthera* (Orchidaceae) - The result of adaptation to pollinating moths. *Nordic Journal of Botany*, 13:607-613.

Vanderplanck, M. (2013). How does physiology interface with ecology? Dietetic constraint in host-plant choices of bees. Thèse de doctorat, Université de Mons, 389 pages.

Vanderplanck, M., Bruneau, E., & Michez, D. (2009). Oligolectisme et décalage phénologique entre plante hôte et pollinisateur: étude de deux espèces printanières psammophiles, *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera, Colletidae) et *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae). *OSMIA*, 3 : 23-27.

Vanderplanck, M., Michez, D., Vancraenenbroeck, S. and Lognay, G. (2011). Micro-quantitative method for analysis of sterol levels in honeybees and their pollen loads. *Analytical Letters*, 44 (10): 1807-1820.

Vanderplanck, M., Leroy, B., Wathelet, B., Wattiez, R. and Michez, D. (2014). Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidologie*, DOI 10.1007/s13592-013-0239-0.

Vereecken, N.J., Toffin, E., Gosselin, M., & Michez, D. (2006). Observation relatives à la biologie et à la nidification de quelques abeilles sauvages psammophiles d'intérêt en Wallonie. 1. Observations printanières. *Parcs & Réserves*, 61 (1) : 8-13.

Vereecken, N.J., Wilson, C. A., Hötling, S., Schulz, S., Banketov, S. A., & Mardulyn, P. (2012). Pre-adaptations and the evolution of pollination by sexual deception: Cope's rule of specialization revisited. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1748), 4786–4794.

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Wäckers, F.L. (2004). Assessing the suitability of flowering herbs as parasitoid food sources: flower attractiveness and nectar accessibility. *Biological Control*, Vol 29, Issue 3, pp 307–314.

Wcislo, W.T. and Cane, J.H. (1996). Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera: Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annual Review of Entomology*, 41: 257-286.

Weiner, C. N., Hilpert, A., Werner, M., Linsenmair, K. E. and Bluthgen, N. (2010). Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie*, 41 (4): 476-487.

Westerkamp, C. (1997). Flowers and bees are competitors-not partners. Towards a new understanding of complexity in specialised bee flowers. *Acta Horticulturae*, 437: 71-74.

Westrich, P. (1989). *Die Wildbienen Baden-Württembergs*. Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany.

White, T.M., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (2012). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press.

Wu, J., Nyman, T., Wang, D. C., Argus, G. W., Yang, Y. P., & Chen, J. H. (2015). Phylogeny of *Salix* subgenus *Salix* s.l. (Salicaceae): delimitation, biogeography, and reticulate evolution. *BMC evolutionary biology*, 15(1), 1.

Zhen-Fu, F. (1987). On the distribution and origin of *Salix* in the world. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 25 (4): 307-313.

10 Annexes

10.1 Contenu

10.1.1 Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés totaux

10.1.2 Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés essentiels

Tableau A1 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés totaux

	<i>Salix alba</i>	<i>S. appendiculata</i>	<i>S. atrocinerea</i>	<i>S. caprea</i>	<i>S. cinerea</i>
<i>Salix alba</i>					
<i>S. appendiculata</i>	F _{4,1} =2.731892 ; p=0,001				
<i>S. atrocinerea</i>	F _{7,1} =1.460606 ; p=0,258	F _{7,1} =39.4388 ; p=0,004			
<i>S. caprea</i>	F _{10,1} =0.3941965 ; p=0,621	F _{10,1} =5.599212 ; p=0,035	F _{13,1} =0.5390731 ; p=0,456		
<i>S. cinerea</i>	F _{4,1} =1.942081 ; p=0,221	F _{4,1} =6.202853 ; p=0,034	F _{7,1} =2.992255 ; p=0,081	F _{10,1} =3.82976 ; p=0,083	
<i>S. dichroa</i>	F _{4,1} =1.583163 ; p=0,202	F _{4,1} =31.78127 ; p=0,039	F _{7,1} =11.52308 ; p=0,002	F _{10,1} =2.575945 ; p=0,096	F _{4,1} =2.706087 ; p=0,116
<i>S. integra</i>	F _{4,1} =3.040831 ; p=0,122	F _{4,1} =2.855632 ; p=0,059	F _{7,1} =23.72378 ; p=0,001	F _{10,1} =7.271166 ; p=0,02	F _{4,1} =5.681654 ; p=0,027
<i>S. irrorata</i>	F _{4,1} =1.420141 ; p=0,116	F _{4,1} =13.46077 ; p=0,02	F _{7,1} =5.083536 ; p=0,003	F _{10,1} =2.676264 ; p=0,114	F _{4,1} =1.862127 ; p=0,211
<i>S. muscina</i>	F _{4,1} =0.1965173 ; p=0,759	F _{4,1} =3.466574 ; p=0,115	F _{7,1} =2.792849 ; p=0,114	F _{10,1} =0.5884565 ; p=0,512	F _{4,1} =2.179238 ; p=0,128
<i>S. repens rosmarinifolia</i>	F _{4,1} =1.435387 ; p=0,328	F _{4,1} =0.7520745 ; p=0,522	F _{7,1} =7.039969 ; p=0,001	F _{10,1} =5.028675 ; p=0,056	F _{4,1} =3.806719 ; p=0,04
<i>S. sericans</i>	F _{4,1} =19.12908 ; p=0,055	F _{4,1} =86.61745 ; p=0,037	F _{7,1} =68.84332 ; p=0,005	F _{10,1} =30.69351 ; p=0,003	F _{4,1} =2.502956 ; p=0,013
<i>S. suboposita</i>	F _{4,1} =10.1548 ; p=0,024	F _{4,1} =105.9959 ; p=0,068	F _{7,1} =42.78123 ; p=0,013	F _{10,1} =13.6608 ; p=0,003	F _{4,1} =0.8404441 ; p=0,411
<i>S. triandra</i>	F _{4,1} =3.288046 ; p=0,121	F _{4,1} =86.08497 ; p=0,008	F _{7,1} =11.47725 ; p=0,007	F _{10,1} =4.119585 ; p=0,04	F _{4,1} =1.130021 ; p=0,325
<i>S. wimmeriana</i>	F _{4,1} =0.5610223 ; p=0,525	F _{4,1} =10.29664 ; p=0,033	F _{7,1} =1.042555 ; p=0,331	F _{10,1} =0.4979471 ; p=0,52	F _{4,1} =1.190878 ; p=0,404
<i>S. x multinervis</i>	F _{4,1} =0.2030104 ; p=0,803	F _{4,1} =3.124934 ; p=0,131	F _{7,1} =6.186835 ; p=0,028	F _{10,1} =0.9966389 ; p=0,352	F _{4,1} =3.079182 ; p=0,012
<i>S. x rubens</i>	F _{10,1} =1.410882 ; p=0,251	F _{10,1} =4.991195 ; p=0,043	F _{13,1} =1.6098 ; p=0,214	F _{16,1} =3.217924 ; p=0,065	F _{10,1} =0.551898 ; p=0,551
<i>S. apemina</i>	F _{4,1} =44.08192 ; p=0,077	F _{14,1} =136.3804 ; p=0,025	F _{7,1} =197.1989 ; p=0,001	F _{10,1} =72.99486 ; p=0,001	F _{4,1} =16.06884 ; p=0,001
<i>S. udensis</i>	F _{4,1} =60.45048 ; p=0,011	F _{4,1} =247.8495 ; p=0,011	F _{7,1} =319.8835 ; p=0,002	F _{10,1} =92.10995 ; p=0,001	F _{4,1} =19.14116 ; p=0,001
Total p < 0,05	3	11	10	6	6

Tableau A1 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés totaux (suite)

	<i>S. dichroa</i>	<i>S. integra</i>	<i>S. irrorata</i>	<i>S. muscina</i>	<i>S. repens rosmarinifolia</i>
<i>Salix alba</i>					
<i>S. appendiculata</i>					
<i>S. atrocinerea</i>					
<i>S. caprea</i>					
<i>S. cinerea</i>					
<i>S. dichroa</i>					
<i>S. integra</i>	F _{4,1} =5.02543 ; p=0,129				
<i>S. irrorata</i>	F _{4,1} =0.7156085 ; p=0,528	F _{4,1} =4.522333 ; p=0,098			
<i>S. muscina</i>	F _{4,1} =1.744101 ; p=0,319	F _{4,1} =2.915222 ; p=0,101	F _{4,1} =1.725949 ; p=0,152		
<i>S. repens rosmarinifolia</i>	F _{4,1} =1.676698 ; p=0,217	F _{4,1} =0.1243183 ; p=0,826	F _{4,1} =1.946413 ; p=0,234	F _{4,1} =1.256601 ; p=0,374	
<i>S. sericans</i>	F _{4,1} =38.52963 ; p=0,027	F _{4,1} =41.09552 ; p=0,001	F _{4,1} =19.24555 ; p=0,02	F _{4,1} =26.15048 ; p=0,068	F _{4,1} =13.75014 ; p=0,001
<i>S. suboposita</i>	F _{4,1} =31.32668 ; p=0,023	F _{4,1} =30.38288 ; p=0,001	F _{4,1} =9.069744 ; p=0,001	F _{4,1} =15.5108 ; p=0,065	F _{4,1} =8.039817 ; p=0,001
<i>S. triandra</i>	F _{4,1} =10.77885 ; p=0,104	F _{4,1} =15.04582 ; p=0,001	F _{4,1} =1.235372 ; p=0,308	F _{4,1} =5.19681 ; p=0,024	F _{4,1} =3.748805 ; p=0,001
<i>S. wimmeriana</i>	F _{4,1} =2.754887 ; 0,103	F _{4,1} =7.163264 ; p=0,001	F _{4,1} =2.085082 ; p=0,2	F _{4,1} =0.724243 ; p=0,408	F _{4,1} =2.679625 ; p=0,102
<i>S. x multinervis</i>	F _{4,1} =4.301254 ; p=0,001	F _{4,1} =3.514729 ; p=0,118	F _{4,1} =3.751482 ; p=0,098	F _{4,1} =0.376076 ; p=0,717	F _{4,1} =1.140149 ; p=0,387
<i>S. x rubens</i>	F _{10,1} =0.9701156 ; p=0,339	F _{10,1} =3.922576 ; p=0,05	F _{10,1} =0.422205 ; p=0,621	F _{10,1} =1.58378 ; p=0,207	F _{10,1} =3.837799 ; p=0,051
<i>S. apennina</i>	F _{4,1} =117.7128 ; p=0,057	F _{4,1} =74.8861 ; p=0,027	F _{4,1} =67.76592 ; p=0,006	F _{4,1} =61.08481 ; p=0,077	F _{4,1} =24.50347 ; p=0,001
<i>S. udensis</i>	F _{4,1} =217.2195 ; p=0,027	F _{4,1} =110.8079 ; p=0,014	F _{4,1} =100.23 ; 0,001	F _{4,1} =88.21342 ; p=0,07	F _{4,1} =30.88087 ; p=0,011
Total p < 0,05	4	6	4	1	5

Tableau A1 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés totaux (suite)

	<i>S. sericans</i>	<i>S. suboposita</i>	<i>S. triandra</i>	<i>S. wimmeriana</i>	<i>S. x multinervis</i>
<i>Salix alba</i>					
<i>S. appendiculata</i>					
<i>S. atrocinerea</i>					
<i>S. caprea</i>					
<i>S. cinerea</i>					
<i>S. dichroa</i>					
<i>S. integra</i>					
<i>S. irrorata</i>					
<i>S. muscina</i>					
<i>S. repens rosmarinifolia</i>					
<i>S. sericans</i>					
<i>S. suboposita</i>	F _{4,1} =5.850812 ; p=0,146				
<i>S. triandra</i>	F _{4,1} =24.06136 ; p=0,013	F _{4,1} =13.14679 ; p=0,24			
<i>S. wimmeriana</i>	F _{4,1} =23.5874 ; p=0,036	F _{4,1} =12.93814 ; p=0,019	F _{4,1} =4.015162 ; p=0,026		
<i>S. x multinervis</i>	F _{4,1} =39.70541 ; p=0,045	F _{4,1} =29.05409 ; p=0,008	F _{4,1} =12.56191 ; p=0,018	F _{4,1} =2.019313 ; p=0,196	
<i>S. x rubens</i>	F _{10,1} =3.913826 ; p=0,059	F _{10,1} =0.6742819 ; p=0,509	F _{10,1} = -0.03287257 ; p=0,985	F _{10,1} =0.8895265 ; p=0,374	F _{10,1} =2.357248 ; p=0,151
<i>S. apennina</i>	F _{4,1} =62.82753 ; p=0,001	F _{4,1} =90.92538 ; p=0,02	F _{4,1} =115.4079 ; p=0,016	F _{4,1} =61.49462 ; p=0,079	F _{4,1} =79.84956 ; p=0,039
<i>S. udensis</i>	F _{4,1} =81.73286 ; p=0,015	F _{4,1} =150.9253 ; p=0,074	F _{4,1} =220.3778 ; p=0,064	F _{4,1} =93.00318 ; p=0,023	F _{4,1} =122.7816 ; p=0,024
Total p < 0,05	5	3	3	1	2

A. DUHIN – Évolution de l'interaction entre l'espèce d'abeille solitaire *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea) et les saules (genre *Salix* L., Salicaceae) – 2016

Tableau A1 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés totaux (suite)

	<i>S. x rubens</i>	<i>S. apennina</i>	<i>S. udensis</i>	Total p < 0,05
<i>Salix alba</i>				
<i>S. appendiculata</i>				1
<i>S. atrocinerea</i>				1
<i>S. caprea</i>				1
<i>S. cinerea</i>				1
<i>S. dichroa</i>				2
<i>S. integra</i>				3
<i>S. irrorata</i>				2
<i>S. muscina</i>				0
<i>S. repens rosmarinifolia</i>				2
<i>S. sericans</i>				8
<i>S. subopposita</i>				7
<i>S. triandra</i>				7
<i>S. wimmeriana</i>				5
<i>S. x multinervis</i>				6
<i>S. x rubens</i>				1
<i>S. apennina</i>	F _{10,1} =20.09562 ; p=0,001			12
<i>S. udensis</i>	F _{10,1} =23.67907 ; p=0,001	F _{4,1} = 2.705274 ; p=0,222		13
Total p < 0,05	2	0		

Tableau A2 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés essentiels

	<i>Salix alba</i>	<i>S. appendiculata</i>	<i>S. atrocinerea</i>	<i>S. caprea</i>	<i>S. cinerea</i>
<i>Salix alba</i>					
<i>S. appendiculata</i>	F _{4,1} =2.554082 ; p=0,085				
<i>S. atrocinerea</i>	F _{7,1} =1.25276 ; p=0,301	F _{7,1} =32.83642 ; p=0,001			
<i>S. caprea</i>	F _{10,1} =0.10948 ; p=0,822	F _{10,1} =4.538256 ; p=0,062	F _{13,1} =0.888618 ; p=0,358		
<i>S. cinerea</i>	F _{4,1} =2.343548 ; p=0,153	F _{4,1} =7.13903 ; p=0,021	F _{7,1} =3.661953 ; p=0,077	F _{10,1} =5.067121 ; p=0,046	
<i>S. dichroa</i>	F _{4,1} =1.001628 ; p=0,229	F _{4,1} =33.17897 ; p=0,057	F _{7,1} =3.551075 ; p=0,051	F _{10,1} =1.395173 ; p=0,265	F _{4,1} =2.32866 ; p=0,08
<i>S. integra</i>	F _{4,1} =1.82614 ; p=0,206	F _{4,1} =1.420559 ; p=0,284	F _{7,1} =16.04561 ; p=0,004	F _{10,1} =4.275102 ; p=0,055	F _{4,1} =5.91343 ; p=0,091
<i>S. irrorata</i>	F _{4,1} =1.006452 ; p=0,22	F _{4,1} =12.48825 ; p=0,011	F _{7,1} =2.14949 ; p=0,142	F _{10,1} =1.725295 ; p=0,21	F _{4,1} =1.549031 ; p=0,305
<i>S. muscina</i>	F _{4,1} =0.02096434 ; p=0,821	F _{4,1} =3.711952 ; p=0,11	F _{7,1} =2.065347 ; p=0,175	F _{10,1} =0.2413948 ; p=0,65	F _{4,1} =2.640039 ; p=0,125
<i>S. repens rosmarinifolia</i>	F _{4,1} =1.0093 ; p=0,5	F _{4,1} =0.3660172 ; p=0,833	F _{7,1} =5.312287 ; p=0,015	F _{10,1} =3.356422 ; p=0,075	F _{4,1} =3.883057 ; p=0,095
<i>S. sericans</i>	F _{4,1} =23.81531 ; p=0,035	F _{4,1} =110.0854 ; p=0,017	F _{7,1} =80.98363 ; p=0,01	F _{10,1} =36.32896 ; p=0,001	F _{4,1} =2.630858 ; p=0,099
<i>S. suboposita</i>	F _{4,1} =11.38008 ; p=0,073	F _{4,1} =110.6603 ; p=0,035	F _{7,1} =40.26591 ; p=0,014	F _{10,1} =15.17665 ; p=0,001	F _{4,1} =0.4904809 ; p=0,521
<i>S. triandra</i>	F _{4,1} =2935811 ; p=0,164	F _{4,1} =80.62765 ; p=0,075	F _{7,1} =7.416519 ; p=0,034	F _{10,1} =3.665736 ; p=0,068	F _{4,1} =0.9247283 ; p=0,554
<i>S. wimmeriana</i>	F _{4,1} =0.4293964 ; p=0,593	F _{4,1} =9.655079 ; p=0,026	F _{7,1} =0.2538359 ; p=0,656	F _{10,1} =0.4882481 ; p=0,507	F _{4,1} =1.405461 ; p=0,344
<i>S. x multinervis</i>	F _{4,1} =0.09154245 ; p=0,8	F _{4,1} =2.874453 ; p=0,145	F _{7,1} =4.147953 ; p=0,045	F _{10,1} =0.4705648 ; p=0,528	F _{14,1} =3.370852 ; p=0,069
<i>S. x rubens</i>	F _{10,1} =1.675595 ; p=0,2	F _{10,1} =5.640149 ; p=0,03	F _{13,1} =1.779352 ; p=0,165	F _{16,1} =4.084108 ; p=0,066	F _{10,1} =0.3852317 ; p=0,622
<i>S. apennina</i>	F _{4,1} =13.14922 ; p=0,019	F _{4,1} =55.43353 ; p=0,053	F _{7,1} =45.57411 ; p=0,003	F _{10,1} =19.42532 ; p=0,004	F _{4,1} =4.699194 ; p=0,013
<i>S. udensis</i>	F _{4,1} =21.75172 ; p=0,041	F _{4,1} =117.3583 ; p=0,085	F _{7,1} =88.48949 ; p=0,011	F _{10,1} =29.72057 ; p=0,001	F _{4,1} =5.076035 ; p=0,008
Total (p < 0,05)	3	7	8	4	2

Tableau A2 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés essentiels (suite)

	<i>S. dichroa</i>	<i>S. integra</i>	<i>S. irrorata</i>	<i>S. muscina</i>	<i>S. repens rosmarinifolia</i>
<i>Salix alba</i>					
<i>S. appendiculata</i>					
<i>S. atrocinerea</i>					
<i>S. caprea</i>					
<i>S. cinerea</i>					
<i>S. dichroa</i>					
<i>S. integra</i>	F _{4,1} =6.082762 ; p=0,015				
<i>S. irrorata</i>	F _{4,1} =0.3054761 ; p=0,557	F _{4,1} =4.711773 ; p=0,105			
<i>S. muscina</i>	F _{4,1} =1.458184 ; p=0,325	F _{4,1} =2.130907 ; p=0,194	F _{4,1} =1.39727 ; p=0,217		
<i>S. repens rosmarinifolia</i>	F _{4,1} =1.937383 ; p=0,101	F _{4,1} =0.07656332 ; p=0,845	F _{4,1} =2.102636 ; p=0,097	F _{4,1} =0.9874732 ; p=0,415	
<i>S. sericans</i>	F _{4,1} =49.18797 ; p=0,061	F _{4,1} =49.47573 ; p=0,019	F _{4,1} =22.95363 ; p=0,001	F _{4,1} =32.81873 ; p=0,05	F _{4,1} =15.22042 ; p=0,001
<i>S. suboposita</i>	F _{4,1} =31.38321 ; p=0,023	F _{4,1} =32.01227 ; p=0,001	F _{4,1} =9.058197 ; p=0,001	F _{4,1} =17.22167 ; p=0,051	F _{4,1} =8.393593 ; p=0,001
<i>S. triandra</i>	F _{4,1} =7.199654 ; 0,061	F _{4,1} =14.553 ; p=0,001	F _{4,1} =0.793268 ; p=0,591	F _{4,1} =4.858236 ; p=0,071	F _{4,1} =3.723099 ; p=0,001
<i>S. wimmeriana</i>	F _{4,1} =1.173673 ; p=0,323	F _{4,1} =5.449184 ; p=0,123	F _{4,1} =0.8278913 ; p=0,432	F _{4,1} =0.6312348 ; p=0,423	F _{4,1} =2.068995 ; 0,094
<i>S. x multinervis</i>	F _{4,1} =3.077029 ; p=0,007	F _{4,1} =1.778909 ; p=0,095	F _{4,1} =2.586516 ; p=0,234	F _{4,1} =0.1319474 ; p=0,711	F _{4,1} =0.7694933 ; p=0,405
<i>S. x rubens</i>	F _{10,1} =0.8487959 ; p=0,359	F _{10,1} =4.406919 ; p=0,04	F _{10,1} =0.4872481 ; 0,561	F _{10,1} =1.809508 ; p=0,197	F _{10,1} =4.461213 ; p=0,039
<i>S. apennina</i>	F _{4,1} =33.75288 ; p=0,017	F _{4,1} =29.12035 ; p=0,001	F _{4,1} =18.10248 ; p=0,001	F _{4,1} =18.56916 ; 0,026	F _{4,1} =8.535781 ; p0,001
<i>S. udensis</i>	F _{4,1} =75.57915 ; p=0,052	F _{4,1} =49.98918 ; p=0,001	F _{4,1} =28.87132 ; p=0,001	F _{4,1} =33.05157 ; p=0,015	F _{4,1} =12.73298 ; p=0,001
Total (p < 0,05)	4	6	4	2	6

Tableau A2 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés essentiels (suite)

	<i>S. sericans</i>	<i>S. suboposita</i>	<i>S. triandra</i>	<i>S. wimmeriana</i>	<i>S. x multinervis</i>
<i>Salix alba</i>					
<i>S. appendiculata</i>					
<i>S. atrocinerea</i>					
<i>S. caprea</i>					
<i>S. cinerea</i>					
<i>S. dichroa</i>					
<i>S. integra</i>					
<i>S. irrorata</i>					
<i>S. muscina</i>					
<i>S. repens rosmarinifolia</i>					
<i>S. sericans</i>					
<i>S. suboposita</i>	F _{4,1} =8.450695 ; p=0,019				
<i>S. triandra</i>	F _{4,1} =35.77437 ; p=0,013	F _{4,1} =16.78097 ; p=0,001			
<i>S. wimmeriana</i>	F _{4,1} =27.38954 ; p=0,063	F _{4,1} =12.37678 ; p=0,016	F _{4,1} =2.248948 ; p=0,126		
<i>S. x multinervis</i>	F _{4,1} =43.1358 ; p=0,059	F _{4,1} =25.71253 ; 0,039	F _{4,1} =9.112649 ; p=0,011	F _{4,1} =1.442721 ; p=0,307	
<i>S. x rubens</i>	F _{10,1} =4.54477 ; p=0,046	F _{10,1} =0.6402443 ; p=0,495	F _{10,1} =0.02912043 ; p=0,949	F _{10,1} =0.8149158 ; p=0,387	F _{10,1} =2.513363 ; p=0,101
<i>S. apennina</i>	F _{4,1} =41.75556 ; p=0,017	F _{4,1} =35.94622 ; p=0,001	F _{4,1} =33.08509 ; p=0,001	F _{4,1} =15.92171 ; p=0,094	F _{4,1} =22.39226 ; p=0,001
<i>S. udensis</i>	F _{4,1} =41.06426 ; p=0,029	F _{4,1} =42.54686 ; p=0,052	F _{4,1} =64.6871 ; p=0,016	F _{4,1} =28.15398 ; p=0,007	F _{4,1} =41.50189 ; p=0,001
Total (p < 0,05)	5	4	3	1	2

Tableau A2 : Résultats des analyses pair par pair (Pairwise) pour le contenu en acides aminés essentiels (suite)

	<i>S. x rubens</i>	<i>S. apennina</i>	<i>S. udensis</i>	Total (p < 0,05)
<i>Salix alba</i>				
<i>S. appendiculata</i>				0
<i>S. atrocinerea</i>				1
<i>S. caprea</i>				0
<i>S. cinerea</i>				1
<i>S. dichroa</i>				0
<i>S. integra</i>				2
<i>S. irrorata</i>				1
<i>S. muscina</i>				0
<i>S. repens rosmarinifolia</i>				1
<i>S. sericans</i>				7
<i>S. subopposita</i>				8
<i>S. triandra</i>				5
<i>S. wimmeriana</i>				2
<i>S. x multinervis</i>				4
<i>S. x rubens</i>				4
<i>S. apennina</i>	F _{10,1} =5.849408 ; p=0,005			14
<i>S. udensis</i>	F _{10,1} =6.545171 ; p=0,001	F _{4,1} =2.653953 ; p=0,196		13
Total (p < 0,05)	2	0		